



**You have downloaded a document from
RE-BUS
repository of the University of Silesia in Katowice**

Title: Wpływ leków antyretrowirusowych (indinawir i zidowudyna) na rozwój kości noworodków szczurzych

Author: Karina Maciejewska

Citation style: Maciejewska Karina. (2012). Wpływ leków antyretrowirusowych (indinawir i zidowudyna) na rozwój kości noworodków szczurzych. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



UNIwersYTET ŚLĄSKI
W KATOWICACH



Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

Uniwersytet Śląski w Katowicach

Instytut Fizyki

Zakład Fizyki Medycznej

Karina Maciejewska

**Wpływ leków antyretrowirusowych
(indinawir i zidowudyna) na rozwój
kości noworodków szczurzych**

Praca doktorska

Promotor:

Prof. zw. dr hab. Zofia Drzazga

Katowice 2012r.

Słowa

kluczowe: fluorescencja X, fluorescencja LIF, radiografia cyfrowa, kość,
indinawir, zidowudyna
(max 5)

Oświadczenie autora pracy

Świadoma/y odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza praca została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem tytułu zawodowego w wyższej uczelni.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data

Podpis autora pracy

.....

*Serdeczne podziękowania
składam Pani prof. zw. dr hab.
Zofii Drzazga za opiekę
naukową i poświęcony czas,
prof. dr hab. H. Trzeciakowi za
dostarczenie materiału
badawczego,
dr Katarzynie Michalik za
wsparcie i cenne uwagi,
dr Michałowi Kaszubie za
udostępnienie stanowiska
pomiarowego.*

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI	4
WYKAZ SKRÓTÓW	6
WPROWADZENIE	8
CEL PRACY	9
WSTĘP TEORETYCZNY	11
Zagrożenia AIDS	11
Budowa i mineralizacja kości	15
Rola Pierwiastków w Kościach	18
Nowoczesne Metody Fizyczne Badania Kości	21
Analiza fluorescencyjna indukowana promieniowaniem X	21
Fluorescencja w zakresie UV-VIS	30
Radiografia cyfrowa	35
MATERIAŁ I METODYKA	37
MATERIAŁ BADAWCZY	37
TECHNIKI POMIAROWE	40
XRF	40
LIF	42
RADIOGRAFIA CYFROWA	43
ANALIZA DANYCH	45
WYNIKI BADAŃ I ICH ANALIZA	46
Wyniki badań wykonane techniką XRF	46
Widma XRF w funkcji obszaru kości	56
Widma XRF w zależności od typu kości	56
Widma XRF w funkcji wieku szczurów	57
Wpływ stosowania leków indinawir i zidowudyna na widma XRF	59
Wyniki badań uzyskane metodą fluorescencji LIF	65
Widma LIF w zależności od wieku szczura	65
Widma LIF w zależności od typu kości	66
Widma LIF w zależności od obszaru na kości	67
Wpływ leków indinawir i zidowudyna na fluorescencję LIF	67

Wyniki pomiarów uzyskane metodą radiografii cyfrowej	72
Analiza statystyczna wyników pomiarów kości szczurów	75
Różnice między kośćmi symetrycznymi.	75
Zmiany z wiekiem szczurów.....	76
Wyniki badań metodą XRF	76
Wyniki badań metodą LIF	88
Różnice między typami kości.	92
Wyniki badań metodą XRF	92
Wyniki badania metodą LIF	95
Różnice między obszarami kości.....	95
Różnice wynikające z wpływu leków.....	96
Wyniki badania metodą XRF.....	96
Wyniki badania metodą LIF	105
Wyniki badania metodą Radiografii cyfrowej.....	108
DYSKUSJA WYNIKÓW	112
Różnice w macierzy nieorganicznej i organicznej związane z wiekiem szczurów.	112
Macierz nieorganiczna	112
Macierz organiczna	114
Różnice między typami kości i pomiędzy poszczególnymi ich obszarami.	115
Różnice między typami kości.....	115
Różnice między obszarami kości.	116
Wpływ leków podawanych samicom szczurzym w czasie ciąży	116
Wpływ indinawiru	116
Wpływ zidowudyny	118
WNIOSKI	120
LITERATURA.....	122
SPIS RYSUNKÓW	131
SPIS TABEL.....	136

WYKAZ SKRÓTÓW

μ -PIXE – emisja promieniowania X wzbudzana cząstkami naładowanymi

AIDS - zespół nabytego niedoboru odporności

AKP - fosfataza alkaliczna

ARW - intensywne leczenie antyretrowirusowe

BMD - gęstość masy kostnej

BSP – sialoproteina kości

CART - złożona terapia przeciwretrowirusowa

CCD – matryca z elementami światłoczułymi

DICOM - obrazowanie cyfrowe i wymiana obrazów w medycynie

DTA - termiczna analiza różnicowa

EDXRF - fluorescencja wzbudzana promieniowaniem rentgenowskim z dyspersją energii

EtNBS – barwnik benzofenotiazynowy

EXAFS – spektroskopia subtelnej struktury progu absorpcji

FAD - dinukleotyd flawinoadeninowy

FDA – Amerykańska Agencja ds. Żywności I Leków

FET – tranzystor polowy

FMN – mononukleotyd flawinowy

FP – metoda parametrów fundamentalnych

HAART – wysoce aktywna terapia antyretrowirusowa

HDPE - polietylen wysokiej gęstości

HIV – ludzki wirus niedoboru odporności

IF - inhibitory fuzji

IGF-I - insulino-zależny czynnik wzrostu 1

IP - inhibitory proteazy

IR – światło podczerwone

LIF - fluorescencja wzbudzana laserowo

MCA - analizator wielokanałowy

MCV – średnia objętość erytrocytów

NADH - dinukleotyd nikotynoaminoadeninowy

NADPH – fosforan dinukleotydu nikotynoaminoadeninowego
NIST – Narodowy Instytut Materiałów Referencyjnych (USA)
NNRTI - nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy
NRTI - nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy
NtRTI – nukleotydomowe inhibitory odwrotnej transkryptazy
PDD - diagnostyka fotodynamiczna
PDT - terapia fotodynamiczna
PIGE - emisja promieniowania gamma wzbudzana cząstkami naładowanymi
PTH - parathormon
RTD - różnicowanie czasu narastania
RXRF – fluorescencja X wzbudzana promieniowaniem radioizotopowym
SDD – krzemowy detektor dryftowy
SRM BM – referencyjny materiał standaryzowany kości
TG – termograwimetria
UV-VIS – zakres światła ultrafioletowego i widzialnego
XANES – spektroskopia w pobliżu krawędzi absorpcji
XPS – rentgenowska spektrometria fotoelektronów
XRD – dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego
XRF - fluorescencja wzbudzana promieniowaniem X

WPROWADZENIE

Rozwój nauk ścisłych w ostatnich latach, powstawanie nowych i udoskonalanie już stosowanych technik badawczych, a zwłaszcza symbioza między techniką a medycyną i biologią daje ogromne możliwości poprawy jakości życia i zdrowia społeczeństwa. Z drugiej strony choroby cywilizacyjne i społeczne, które rocznie zabijają miliony ludzi na całym świecie, indukują konieczność szukania nowych rozwiązań w profilaktyce, diagnostyce i terapii medycznej. Jedną z takich przewlekłych chorób jest osteoporoza, z którą zmagają się co 10 człowiek na świecie. Charakteryzuje się ona zmniejszeniem masy kostnej, wzmożoną kruchością kości i zwiększonym ryzykiem złamań. Jest niebezpieczna, ponieważ w początkowym stadium przebiega bezobjawowo i często się zdarza, że nie jest diagnozowana aż do momentu, gdy słaby upadek powoduje ciężkie złamanie. Prawidłowa masa kostna jest utrzymywana dzięki obecności minerałów, takich jak wapń, fosfor i inne, związków organicznych oraz pracy hormonów i enzymów utrzymujących ich właściwy poziom. Masa kostna wzrasta w początkowym etapie życia człowieka i osiąga maksimum w wieku ok. 30 lat, a następnie maleje ze względu na przewyższenie aktywności procesów resorpcyjnych nad budulcowymi. Zaburzenie tych procesów powoduje przedwczesną utratę masy kostnej lub jej zwiększony stopień. Takie działanie wykazują m.in. leki antyretrowirusowe stosowane w leczeniu zakażenia wirusem HIV (*ang. human immunodeficiency virus*), który w ostatnich latach coraz częściej dotyka również dzieci ze względu na przeniesienie wirusa z organizmu matki. Działanie toksyczne leków stosowanych przy zarażeniu wirusem HIV czy leczeniu AIDS (*ang. Acquired Immunodeficiency Syndrome*), jest powszechnie znane i na przestrzeni wielu lat ich stosowania zostało dobrze przebadane. W związku z powyższym, interesujące i bardzo ważne jest zrozumienie procesu wzrostu kości, zwłaszcza w początkowym okresie rozwoju organizmu. Jednocześnie bardzo istotne jest określenie wpływu leków antyretrowirusowych stosowanych u ciężarnych kobiet na tkankę kostną ich potomstwa.

CEL PRACY

Badanie zjawisk zachodzących w żywych organizmach i ich skutków daje nam możliwość poznania procesów życiowych w organizmie człowieka. Celem pracy było zbadanie zmian w składzie organicznym i nieorganicznym oraz w gęstości kości noworodków szczurzych w pierwszym etapie rozwoju postnatalnego, ze względu na to, jak ważny jest pierwszy okres życia człowieka, w którym rozwijają się wszystkie kluczowe funkcje życiowe. Szczur jest dobrym modelem zwierzęcym do badań *in vitro* wykazującym podobieństwo w budowie i procesach życiowych do organizmu człowieka. Skupiono się na materiale kostnym, ponieważ z jednej strony charakteryzuje się dużą trwałością, a jednocześnie tkanka kostna jest ciekawym obiektem badań w dobie postępujących chorób cywilizacyjnych, takich jak osteoporoza czy osteopenia. Wykorzystanie nowoczesnego lasera pracującego w paśmie niskich długości fali (laser fioletowy/niebieski) umożliwiło wzbudzenie endogennych fluoroforów znajdujących się w kościach wykazujących fluorescencję w zakresie odpowiadającym wzbudzeniu długością 407 nm. Zastosowanie miniaturowej lampy rentgenowskiej małej mocy oraz chłodzonego ogniwnem termoelektrycznym detektora i nowoczesnych, ciągle udoskonalanych metod obliczeniowych pozwoliło określić zawartość pierwiastków budujących kości. Dodatkowo nowoczesna technika radiografii cyfrowej pozwoliła na uzyskanie zdjęć badanego materiału o dobrej rozdzielczości z możliwością *postprocessingu* i zaawansowanej analizy ilościowej.

Drugim celem pracy było zbadanie wpływu leków antyretrowirusowych, podawanych ciężarnym samicom szczurzym, na macierz organiczną i nieorganiczną kości ich potomstwa w efekcie długofalowego działania. Zbadano kości szczurów, których matkom podawano w czasie ciąży leki antyretrowirusowe: *indinawir* (200mg/kg) i *zidowudynę* (500gm/kg). Leki te są stosowane powszechnie u ciężarnych kobiet zarażonych wirusem HIV po to, by zapobiec przedostaniu się wirusa HIV do krwioobiegu dziecka. Z

uwagi na niebezpieczeństwo występowania efektów ubocznych leki te należą do kategorii C ustanowionej przez Amerykańską Agencję Leków i Żywności (FDA, *ang. Food And Drug Administration*), co oznacza, że mogą być stosowane jedynie na wyraźne polecenie lekarza specjalisty i tylko wtedy, gdy potencjalna korzyść ich stosowania przewyższa potencjalne ryzyko.

Jest to istotny problem, ponieważ ewentualny niekorzystny wpływ stosowania tych leków na stan tkanki kostnej potomstwa może stanowić dodatkowy argument przeciwko zastosowaniu leku. Do tej pory niestety nie ma wielu doniesień na temat efektów, jakie może wywołać terapia antyretrowirusowa na kościec i zęby organizmów potomnych, co czyni tę pracę ważną w rozwoju gospodarki, biologii i medycyny.

WSTĘP TEORETYCZNY

Zagrożenia AIDS

Zespół nabytego niedoboru odporności, czyli AIDS (*ang. Acquired Immunodeficiency Syndrome*), jest chorobą społeczną, na którą, mimo upływu ponad 30 lat od jej odkrycia, rocznie umiera 2 mln osób. Następuje w wyniku zakażenia wirusem HIV, który atakuje komórki mające receptory CD4, czyli limfocyty T pomocnicze oraz makrofagi, fibroblasty, komórki Langerhansa i nerwowe. Postępujący proces uszkodzania układu immunologicznego powoduje zmniejszenie liczby komórek z receptorem CD4, co oznacza coraz mniejszą liczbę limfocytów T pomocniczych i makrofagów, i niespełnianie swej funkcji przez pozostałe przy życiu komórki. Prowadzi to do zaburzenia funkcji układu immunologicznego, a to z kolei sprzyja zakażeniom pierwotniakowym, grzybiczym, wirusowym i chorobom nowotworowym, a także w mniejszym stopniu zakażeniom bakteryjnym. Najbardziej narażoną grupą społeczną są młodzi ludzie, jednakże coraz częściej zakażeniom ulegają dzieci wskutek przeniesienia wirusa z organizmu matki [1]. Dlatego też stosuje się terapię antyretrowirusową, która ma zapobiec transmisji wirusa HIV z ciężarnej kobiety zarażonej wirusem HIV na jej dziecko [2]. Celem leczenia zakażenia HIV jest poprawa stanu zdrowia, wydłużenie życia i poprawa jego jakości w wyniku zmniejszenia ryzyka nowotworów i zakażeń oportunistycznych, jednak w dalszym ciągu nie jest możliwa całkowita eradykacja wirusa HIV ze względu na przeżywalność wirusa w organizmie [3]. Powstają jednak różne schematy leczenia zawierające pojedyncze leki lub ich kombinacje po to, by ograniczyć lekooporność wirusa oraz zminimalizować ich toksyczność i interakcje. Wśród takich schematów intensywnego leczenia antyretrowirusowego (ARW) są: HAART (*ang. Highly Active Antiretroviral Therapy*) oraz CART (*ang. Combination Antiretroviral Therapy*). Leki antyretrowirusowe są podzielone na cztery klasy ze względu na ich działanie:

- nukleozydowe i nukleotydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy (NRTI i NtRTI)
- nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy (NNRTI)
- inhibitory proteazy HIV (IP)
- inhibitory fuzji (IF).

Inhibitory proteazy powodują zahamowanie proteazy HIV, która jest enzymem kodowanym przez gen *gag-pol* na białka rdzeniowe wirusa i białka prekursorowe enzymów, w wyniku czego potomne cząstki wirusa są niedojrzałe i nie wykazują zakaźności. Leki te są metabolizowane w wątrobie, co wywołuje interakcje między nimi a innymi lekami. Do tej klasy leków antyretrowirusowych należy *indinawir*. Terapie anty-HIV mimo swej skuteczności przeciwko wirusowi, niestety są obarczone efektami ubocznymi.

Nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy (NRTI) ulegają fosforylacji do aktywnych metabolitów i powodują wbudowanie nukleotydu do tworzącego się wirusowego DNA, co zapobiega stabilizacji nici DNA wirusa i powoduje przedwczesne zakończenie jego syntezy. Niestety badania prowadzone nad toksycznością tych leków wykazały m.in. uszkodzenia szpiku kostnego, kwasicę mleczanową, polineuropatię, miopatię, a także uszkodzenie mitochondriów. W skład tej grupy leków wchodzi *zidowudyna*, która była pierwszym lekiem zastosowanym w leczeniu zakażenia HIV. Przenika ona do płynu owodniowego, tkanek płodu i mleka.

U osób przyjmujących *indinawir* występowała kamica nerkowa, w niektórych przypadkach związana z niewydolnością nerek lub ostrą niewydolnością nerek, w większości przypadków przemijająca. Zaobserwowano ostrą niedokrwistość hemolityczną, w niektórych przypadkach ciężką i szybko postępującą. Podejrzewano, że istnieje związek między gromadzeniem się tkanki tłuszczowej w powłokach ciała a przyjmowaniem IP oraz pomiędzy zanikiem tkanki tłuszczowej w niektórych częściach ciała a przyjmowaniem NRTI. Mimo

wieloczynnikowej etiologii martwicy kości, odnotowano przypadki tego schorzenia u osób stosujących CART. W trakcie leczenia ciężarnych pacjentek zakażonych wirusem HIV, u 14% odnotowano hiperbilirubinemię. W badaniach na małpach Rexus, podawanie *indinawiru* noworodkom nasilało łagodnie tę chorobę występującą u tego gatunku po urodzeniu. Wśród działań niepożądanych zaobserwowanych w badaniach klinicznych i po wprowadzeniu leku *indinawir* na rynek farmakologiczny były m.in.: wzrost spontanicznych krwawień u pacjentów z hemofilią, niedokrwistość (w tym ostra niedokrwistość hemolityczna), trombocytopenia, reakcje anafilaktoidalne, wystąpienie lub zaostrzenie cukrzycy lub hiperglikemii, kamica nerkowa, odmiedniczkowe zapalenie nerek, śródmiąższowe zapalenie nerek, niewydolność nerek, ciężka niewydolność nerek, leukocyturia, lipodystrofia (zmiany rozmieszczenia tkanki tłuszczowej w organizmie), zaburzenia metaboliczne (hipertriglicerydemia, hipercholesterolemia, oporność na insulinę, hiperglikemia, zwiększone stężenie moczanów we krwi), zwiększenie wartości MCV krwinek, zmniejszenie liczby granulocytów obojętnochłonnych, krwimocz, białkomocz, obecność kryształów w moczu, ropomocz u dzieci, izolowana bezobjawowa hiperbilirubinemia, zwiększenie stężenia triglicerydów w surowicy, zwiększenie stężenia cholesterolu w surowicy, zaburzenia czynności wątroby, zwiększona aktywność kinazy keratynowej, co świadczy o uszkodzeniu mięśni. W badaniach przedklinicznych u szczurów, jednej małpy i jednego psa stwierdzono kryształy w moczu. U szczurów, którym podawano *indinawir* w dawce ≥ 160 mg/kg mc. na dobę, obserwowano zwiększenie masy tarczycy i przerost komórek pęcherzykowych. Wnikanie leku do tkanki mózgowej było ograniczone, przenikanie do i z układu limfatycznego szybkie, wydzielanie do mleka samic szczurów znaczne, a przenikanie przez barierę łożyskową znaczące u szczurów, a ograniczone u królików. *Indinawir* nie wykazywał działania genotoksycznego ani mutagennego w badaniach z oraz bez aktywacji metabolicznej. Badania na myszach nie

wykazały działania rakotwórczego po zastosowaniu maksymalnej tolerowanej dawki, natomiast badania na szczurach ujawniły zwiększoną częstość gruczolaków tarczycy. W badaniach nad toksycznym wpływem leku *indinawir* na płód, stwierdzono występowanie zwiększonej liczby żeber oraz występowanie żeber szyjnych u szczurów [4]. W innych badaniach na szczurach zaobserwowano anoftalmie u 3% płodów, których matkom podawano w czasie ciąży *indinawir*, co może sugerować opóźnienie w rozwoju [5]. Badania *in vitro* oraz *ex vivo* na komórkach kostnych, wykazały wzrost aktywności osteoklastów, ale też brak wpływu na adipogenezę (produkcję tłuszczów) i lipolizę [6], dziesięciokrotne zmniejszenie kolonii osteoblastów, obniżenie aktywności AKP (fosfatazy alkalinowej) poprzez zahamowanie podziałów komórek zrębu we wczesnym stadium [7], uszkodzenie bioaktywności witaminy D oraz wstrzymanie jej przekształcenia do aktywnej formy [8, 9]. Efekt indinawiru powodujący zaburzenie mineralizacji i obniżenie BMD (*ang. bone mass density*) ujawnił się również w zwiększonym występowaniu osteopenii i osteoporozy, a nawet osteonekrozy u pacjentów leczonych inhibitorami proteazy, co może wynikać z braku zaopatrywania kości w krew poprzez hipertriglicemię i wzmożoną produkcję antyfosfolipidów [9].

Zidowudyna jako analog nukleozydów, blokuje budowę łańcucha wirusowego materiału genetycznego poprzez hamowanie odwrotnej transkryptazy. Wśród niepożądanych reakcji podczas stosowania tego leku jest m.in. możliwa niedokrwistość, neutropenia oraz leukopenia, zapalenie trzustki i kwasica mleczanowa (zwykle powiązana z hepatomegalią i stłuszczeniem wątroby). W badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano uszkodzenie mitochondriów powodowane przez analogi nukleozydów i nukleotydów. U dzieci niezarażonych wirusem HIV, ale narażonych na działanie analogów, występowały zaburzenia czynności układu krwiotwórczego (niedokrwistość, neutropenia), trombocytopenia, pancytopenia z hipolazją szpiku kostnego, aplazja układu czerwono krwinkowego, niedokrwistość plastyczna, kardiomiopatia,

zaburzenia metabolizmu (nadmiar mleczanów, zwiększenie stężenia lipazy), wzrost aktywności enzymów wątrobowych i stężenia bilirubiny we krwi, miopatia oraz zaburzenia neurologiczne. Odnotowano również, tak jak w przypadku *indinawiru*, przypadki martwicy kości. *Zidowudyna* jest przenoszona przez łożysko i wydzielana do mleka kobiecego w stężeniach podobnych do tych w surowicy. Ze względu na możliwość hamowania replikacji DNA komórkowego i włączanie do jądrowego DNA leukocytów, stanowi potencjalne ryzyko dla płodu, a właściwości farmakokinetyczne w ciąży są podobne do obserwowanych kobiet niebędących w ciąży [10]. W testach bakteryjnych nie wykazano mutagenności *zidowudyny*, ale wykazuje aktywność w badaniach in vitro na komórkach ssaków. Lek ten wykazał również uszkodzający wpływ na chromosomy w teście mikrojądrowym u myszy. Zaobserwowano występowanie późnych nowotworów nabłonkowych pochwy po podaniu doustnym myszom i szczurom oraz zwiększoną częstotliwość nowotworów płuc, wątroby i żeńskiego układu rozrodczego u potomstwa myszy narażonego na dawki 420 mg/kg masy ciała podawane ciężarnym samicom [11]. Przy bardzo dużej ekspozycji układowej, zauważono zwiększanie liczby wczesnych śmierci płodów królików i szczurów oraz zwiększenie częstości występowania wad wrodzonych przy podawaniu dawek toksycznych dla matek [12, 13]. *Zidowudyna*, podobnie jak *indinawir*, wykazuje negatywne działanie na komórki kości. Nie wykryto wpływu *zidowudyny* na syntezę macierzy kostnej ani resorpcję kości, jednak zauważono hamowanie syntezy DNA w kulturach kości ciemieniowej u noworodków myszy [14].

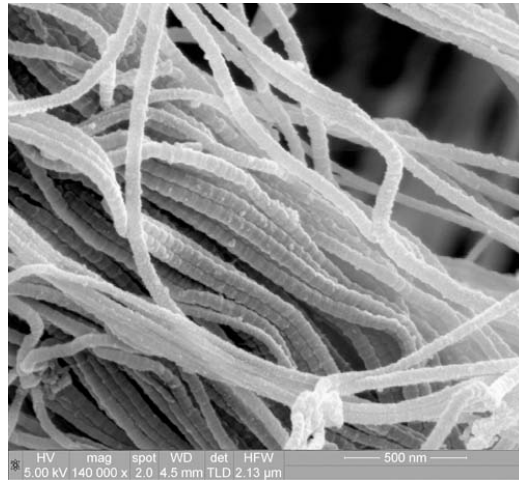
Budowa i mineralizacja kości

Kość jest kompozytem opartym na hydroksyapatycie wapnia, który cechuje się twardością, ale również lekkością. Jest krucha, ale obecność składników organicznych sprawia, że ma pewien stopień elastyczności. Ma niejednorodną architekturę powodującą różną gęstość w różnych obszarach kości. Może być zbita (np. trzony kości długich) lub gąbczasta (nasady

kości). Część powierzchniowa jest zazwyczaj zbita i tworzy największą część masy kostnej. Podczas wzrostu tworzy się początkowa delikatna kość tkana charakteryzująca się nieuporządkowaną siecią włókien kolagenowych, która z czasem zastępowana jest kością mocniejszą blaszkową o równoległych włóknach. Kości długie tworzy kość zbita w trzonie i gąbczasta w nasadach, kości płaskie (np. pokrywy czaszki) tworzą dwie warstwy kości zbitej i gąbczasta pomiędzy nimi. Kości nieregularne mają budowę niejednorodną. Wszystkie kości zbudowane są z trzech grup składników [15, 16]:

- komórki żywe: osteoblasty, osteoklasty i osteocyty. Są zlokalizowane w pobliżu powierzchni kości i biorą udział w tworzeniu i rozkładaniu tkanki kostnej. Osteoblasty produkują enzym AKP (fosfatazę alkalinową), która bierze udział w mineralizacji kości. Osteocyty są tworzone z osteoblastów uwieczonych przez macierz kostną, którą wyprodukowały i znajdują się w jamie kostnej. Ich rola opiera się na formowaniu kości, utrzymywaniu homeostazy wapnia i macierzy kostnej, a także odpowiadają na obciążenie kości jako mechanoreceptory. Osteoklasty z kolei, są odpowiedzialne za resorpcję kości, znajdują się w jamie Howship'a w pobliżu powierzchni kości. Resorpcja kości uruchomiona przez osteoklasty powoduje uwolnienie wapnia rezydującego w kości i w ten sposób działa mechanizm regulujący równowagę w zawartości Ca.

- składniki organiczne. Najważniejszy z nich to kolagen (głównie typu 1). Z innych, niekolagenowych białek zawartych w kościach, najważniejsze to: osteokalcyna, fosfoproteidy, glikoproteiny, sialoproteiny (BSP-I, osteopontyna), osteonektyna, proteoglikany, proteolipidy, trombospondyna, biglikan, dekoryna i fibromodulina [17, 18]. Wyróżnia się 13 typów kolagenu, z czego najważniejszy jest kolagen typu I, ponieważ stanowi on 85-90% białek w kościach i może być mineralizowany (Rys. 1.).



Rys. 1. Zdjęcie z mikroskopu SEM włókien kolagenu [19]

Struktura trzeciorzędowej helisy oraz fakt, iż jest zbudowany z włókien przenoszących obciążenia mechaniczne, daje mu wytrzymałość na rozciąganie i dużą elastyczność. Proteoglikany to białka macierzy zewnątrzkomórkowej, które są syntezowane przez osteoblasty lub absorbowane z osocza i odkładane w macierzy kostnej. W ich skład wchodzi: biglikan i dekoryna, związane z włóknami kolagenu. Biorą one udział w wiązaniu kolagenu oraz adhezji komórkowej do macierzy zewnątrzkomórkowej i błon podstawnych. Osteonektyna wiąże wapń, kryształy hydroksyapatytu i włókna kolagenu. Inicjuje mineralizację i hamuje adhezję osteoblastów. Osteokalcyna reguluje syntezę kryształów hydroksyapatytu, jest też białkiem wskaźnikowym aktywności osteoblastów. Fosfoproteiny, w tym osteopontyna i sialoproteiny, wiążą wapń oraz osteoklasty [16, 18, 20].

- kryształy nieorganiczne (apatyty), nadające kości sztywność i wytrzymałość mechaniczną, których podstawę tworzy hydroksyapatyt $\text{Ca}_{10}(\text{HPO}_4)_6(\text{OH})_2$. Należy jednak podkreślić, że poszczególne grupy funkcyjne są wymieniane na jony lub inne grupy: jony metali, m.in. K, Mg, Cl, Na lub pierwiastki śladowe (Sr, Fe, Zn, Pb, Cu) za Ca; grupa węglanowa za fosforową; fluorowce za grupę hydroksylową. Pierwiastki te regulują działanie komórek kostnych, dlatego ich obecność w strukturze hydroksyapatytu jest istotna.

Proces mineralizacji rozpoczyna się od wytworzenia pęcherzyków macierzy przez komórki kostne. Są one umieszczone wybiórczo w macierzy międzykomórkowej. Pęcherzyki te zawierają enzymy, białka i lipidy, które rozpoczynają proces mineralizacji [21]. W trakcie procesu mineralizacji kości kryształy hydroksyapatytu odkładane są wzdłuż włókien kolagenowych poprzez przyłączanie anionów fosforanowych z ATP w wyniku działania fosfatazy alkalicznej (AKP), powodując powstanie centrów mineralizacji. W dalszej części następuje krystalizacja hydroksyapatytów. W mitochondriach osteoblastów pojawiają się ziarna fosforanu wapnia, które następnie rozprzestrzeniają się [18, 22]. Stopień mineralizacji zależy od komórek tkanki kostnej, czyli stanu metabolicznego całego organizmu, a nie tylko od zjawisk fizykochemicznych zachodzących w miejscu mineralizacji [21].

Jak widać, istotną rolę w budowie i funkcjonowaniu zdrowej tkanki kostnej odgrywa współpraca między wszystkimi jej komponentami. Bardzo ważna jest rola pierwiastków chemicznych, nie tylko głównych, takich jak wapń, czy fosfor, ale również pierwiastków śladowych, które będąc wbudowywanymi w kryształy hydroksyapatytu, sterują istotnymi procesami zachodzącymi w tkance kostnej.

Rola Pierwiastków w Kościach

Wapń jest podstawowym składnikiem mineralnym kości tworzącym kryształy hydroksyapatytu. Jest on wysoce reaktywny w otoczeniu, co pozwala na wymianę jonów. Kości stanowią rezerwuar Ca (99%), natomiast pozostały 1% tworzy tkanki i płyny ustrojowe. Jego metabolizmem sterują m.in. estrogeny produkujące parathormon (PTH), który z kolei stymuluje przemianę witaminy D3 [23]. Obniżenie zawartości hormonów regulujących homeostazę wapnia może doprowadzić do osteoporozy, objawiającej się zmniejszeniem objętości kości pomimo równowagi między składnikami organicznymi a nieorganicznymi, zmiany w mikroarchitekturze kości i zwiększoną łamliwością [24, 25].

Oprócz wapnia, makroelementy obecne w kościach to fosfor i magnez. 85% fosforu znajduje się w kościach tworząc kryształy hydroksyapatytu, ale również biorąc udział w syntezie DNA, enzymów, hormonów i metabolizmie węglowodanów, białek i tłuszczów. Jego niedobór powoduje zaburzenia w budowie masy kostnej. Magnez natomiast będąc w dynamicznej równowadze z wapniem, bierze udział w syntezie białek, tworzeniu rybosomów i kwasów nukleinowych. Wbudowywany w strukturę hydroksyapatytu podlega wymianie z magnezem znajdującym się w płynach ustrojowych.

Oprócz makroelementów występujących w dużych ilościach, bardzo istotną rolę odgrywają w kościach pierwiastki śladowe, których stężenie nie przekracza kilku procent, takie jak: żelazo, cynk, czy stront.

Udowodniono, że zarówno nadmiar, jak i niedobór Fe powoduje obniżoną masę kostną. Jest on ważny w tworzeniu kości, ponieważ bierze udział w syntezie kolagenu, w przekształcaniu witaminy D3 do jej aktywnej postaci, która z kolei jest potrzebna do prawidłowej regulacji i absorpcji Ca i P biorąc udział w mineralizacji kości. Jest kofaktorem hydroksylazy prolinowej i lizylowej, których upośledzenie może doprowadzić do nieprawidłowości w procesie tworzenia kości [26, 27]. Jednocześnie zbyt wysokie stężenie Fe może też obniżyć masę kostną poprzez upośledzenie pracy osteoblastów [28]. Z uwagi na fakt, iż żelazo może być toksyczne, gdy przekroczony zostanie jego poziom, organizmy wykształciły zintegrowany system mechanizmów działających na poziomie komórkowym i ustrojowym, mających na celu utrzymanie jego homeostazy. Odpowiedzialne za to są ferrytyna koordynująca jego transport między tkankami oraz receptor transferryny 1 regulująca jego pobór [29].

Esencjonalną rolę cynku w kościach opisywano wielokrotnie [30-37]. Stymuluje on pracę osteoblastów oraz hamuje funkcjonowanie osteoklastów powodując w ten sposób wzrost masy kostnej poprzez

stymulację IGF-I, czyli insulino-zależnego faktora wzrostu 1 [35]. Jednocześnie reguluje syntezę protein i ekspresję genów odpowiedzialnych za formację kości w komórkach osteoplastycznych i resorpcji kości w osteoklastycznych (aktywując kinazę proteinową C) poprzez aktywację syntetazy aminoacylo-tRNA [34]. Pełni on również anaboliczną rolę w metabolizmie kości, tzn. powoduje przyspieszenie dzielenia się komórek tworzących kość stając się faktorem wzrostu w rosnących zwierzętach i ludziach [Zn2, Zn4]. Udowodniono, iż suplementacja cynkiem przyspiesza leczenie złamań i zapobiega utracie masy kostnej w schorzeniach [30]. Prowadzono także badania, w których pacjenci chorujący na osteoporozę mieli niższą zawartość Zn w kościach niż zdrowi [32]. Wpływ Zn na metabolizm kości przejawia się również w stabilizacji konformacji i utrzymaniu aktywności AKP (fosfatazy zasadowej), znacznikowym enzymem osteoblastów, a także innych metaloenzymów zależnych od Zn. Jednocześnie wykazano, iż nie tylko obniżone stężenie Zn powoduje zburzenie rozwoju kości, ale również jego zbyt duża zawartość, co oznacza, że tylko właściwy poziom cynku korzystnie wpływa na ossyfikację i formację kości [36]. Badania μ -PIXE oraz histochemiczne udowodniły, iż Zn zlokalizowany jest głównie na powierzchni struktur w kościach [37].

Stront był do niedawna uznawany za nieistotny element w organizmie i potencjalnie niebezpieczny [38], jednak ostatnie badania wskazują, iż może pełnić znaczącą rolę w rozwoju kości, choć rola ta jest nadal nie do końca poznana. Badania na szczurach wykazały, iż Sr może być pomocny w osteoporozie, ponieważ jego podaż stymuluje formowanie kości i wzrost objętości skalcyfikowanej kości oraz ogranicza resorpcję kości zapobiegając w ten sposób utracie masy kostnej [39-40]. Najnowsze badania potwierdzają jego anaboliczną i antyresorpcyjną aktywność powodującą wzrost syntezy kolagenu i niekolagenowych białek, wzrost podziałów osteoblastów i zahamowanie podziałów osteoklastów.

Nowoczesne Metody Fizyczne Badania Kości

Do nowoczesnych metod badania kości należą: metody rentgenowskie (XANES, EXAFS, XPS, XRD), metody wykorzystujące promieniowanie świetlne (spektroskopia UV-VIS, IR, anizotropia fluorescencyjna, mikroskopia fluorescencyjna), TG (termograwimetria), DTA (termalna analiza różnicowa), metody chromatograficzne, mikroskopowe i wiele innych. W tej pracy będą wykorzystane: fluorescencja wzbudzana promieniowaniem X (XRF, *ang. X-ray fluorescence*), dzięki której można wyznaczyć stężenia pierwiastków w badanych kościach, fluorescencja wzbudzana laserowo (LIF, *ang. laser induced fluorescence*) dająca informację o składzie organicznym kości oraz radiografia cyfrowa, dzięki której można wykazać różnice w gęstości kości.

Analiza fluorescencyjna indukowana promieniowaniem X

Metoda fluorescencji rentgenowskiej (XRF) jest techniką badania składu pierwiastkowego próbek z wykorzystaniem zjawiska fluorescencji X, którego podstawą jest oddziaływanie fotonów promieniowania emitowanego ze źródła z atomami próbki. Promieniowanie X powoduje wybite elektronu znajdującego się na jednej z niższych powłok, w wyniku czego tworzy się wakansja, która następnie jest zapełniana przez elektron przechodzący z wyższej powłoki emitując w ten sposób kwant promieniowania charakterystycznego. Energia tego fotonu jest związana z liczbą atomową pierwiastka, w którym to przejście następuje. Zależność tę opisuje prawo Moseley'a, które ma postać:

$$1/\lambda = RA^2(Z-\sigma)^2 \quad (1)$$

gdzie λ to długość fali fotonu, R to stała Rydberga, Z to liczba atomowa pierwiastka, σ to stała ekranowania, $A = \sqrt{1/n^2 - 1/m^2}$, n i m to główne liczby kwantowe powłok odpowiednio: na którą przeszedł i z której przeszedł elektron. Z prawa tego wynika, iż dla każdego pierwiastka o znanej liczbie atomowej możemy wyznaczyć energię promieniowania charakterystycznego.

Należy pamiętać, że energia emisji konkretnej linii promieniowania charakterystycznego jest niższa od energii wzbudzenia atomu (progu absorpcji), co związane jest z zasadą Pauli'ego zabraniającą elektronowi przejść z poziomu niższego na wyższy przy całkowitym zapełnieniu powłok. Nie wszystkie linie promieniowania charakterystycznego mają jednak taką samą intensywność. Niektóre linie są bardzo słabe lub nie pojawiają się w ogóle. Oprócz linii dipolowych i kwadrupolowych, w widmie mogą wystąpić inne linie dodatkowe - tzw. linie satelitarne, związane z jednoczesnym wzbudzeniem atomu na różnych powłokach i w związku z tym emisją energii pochodzącej od dwóch przejść elektronów w postaci jednego fotonu.

Zjawiskiem konkurencyjnym do fluorescencji X jest efekt Auger'a, który również polega na wybiciu przez padający foton promieniowania pierwotnego elektronu z wewnętrznej powłoki i emisji promieniowania charakterystycznego. Jednak w tym przypadku taki foton promieniowania charakterystycznego powoduje wybite drugiego elektronu z tej samej powłoki, tzw. elektronu Auger'a. Największe prawdopodobieństwo efektu Auger'a występuje w lekkich pierwiastkach.

Występowanie jednocześnie zjawiska fluorescencji i Auger'a powoduje zmniejszenie liczby kwantów promieniowania charakterystycznego wykrywanego przez układ detekcyjny. Stąd można określić tzw. wydajność fluorescencji, która jest stosunkiem liczby fotonów fluorescencyjnych wyemitowanych z danej powłoki do liczby wszystkich atomów wzbudzonych na tej powłoce w tym samym czasie.

Sąsiedztwo innych atomów w próbkach wielopierwiastkowych może spowodować przejścia z powłok walencyjnych w związku z oddziaływaniem tych właśnie sąsiednich atomów, co z kolei wpływa na konfigurację elektronową wewnętrznych powłok. Ma to znaczenie głównie w przypadku lekkich pierwiastków, których powłoki L czy M są powłokami walencyjnymi

lub pierwiastków przejściowych, których powłoki wewnętrzne są tylko częściowo wypełnione.

Oprócz zjawisk bazujących na efekcie fotoelektrycznym, istotnym oddziaływaniem promieniowania X z materią jest rozpraszanie: komptonowskie niekoherentne rozpraszanie fotonów na słabo związanych elektronach z powłoki walencyjnej, koherentne rozpraszanie fotonów Rayleigh'a na elektronach mocno związanych w atomie i rozpraszanie fotonów Thomsona na jądrach atomowych.

Rozpraszanie komptonowskie powoduje przekazanie części energii padającego fotonu elektronowi uzyskującemu w ten sposób energię kinetyczną i jednocześnie zmianę toru i energii (długości fali) padającego fotonu. Najmniejsze prawdopodobieństwo rozproszenia fotonu o niskiej energii występuje dla kąta 90° . Prawdopodobieństwo to maleje liniowo wraz ze wzrostem energii padającego fotonu, jak również wraz z liczbą atomową pierwiastka rozpraszającego, co przedstawia poniższy wzór:

$$\mu_c = \sigma_e N \sum w_i (Z_i/A_i), \quad (2)$$

gdzie μ_c to masowy współczynnik absorpcji związany z rozproszeniem komptonowskim, σ_e to przekrój czynny na rozpraszanie Comptona pojedynczego fotonu, N to liczba Avogadro, w_i to ułamek wagowy pierwiastka o liczbie atomowej Z_i i liczbie masowej A_i . W związku z tym zjawisko to dominuje w bardzo lekkich pierwiastkach.

Ze wzrostem liczby atomowej pierwiastków i/lub energii padających fotonów rośnie prawdopodobieństwo rozpraszania koherentnego, ponieważ coraz więcej silnie związanych elektronów bierze w nim udział. Odrzut takich elektronów jest zaniedbywalny, co powoduje, że foton nie traci energii. Efekt ten jest największy w kierunku zgodnym z kierunkiem fotonu. Prawdopodobieństwo rozpraszania koherentnego można zapisać następująco:

$$\mu_{koh}=k\sum w_i(Z_i^3/A_i), \quad (3)$$

gdzie μ_{koh} to masowy współczynnik absorpcji związany z rozproszeniem koherentnym, a k to stała związana z geometrią układu i energią promieniowania. Warto zauważyć, że ten rodzaj rozpraszania ma największy udział w przypadku oddziaływania fotonów o niskich energiach (<100keV) z ciężkimi pierwiastkami. Zachodzi tu jednak silna absorpcja fotoelektryczna padającego promieniowania.

Wszystkie te zjawiska osłabiają promieniowanie padające, czego wynikiem jest dobrze znane prawo absorpcji promieniowania X. Średni współczynnik osłabienia promieniowania X zależy od składu chemicznego próbki, co oznacza, że wszelkie zmiany w kompozycji chemicznej spowodują osłabienie zarówno promieniowania pierwotnego, jak i fluorescencji, skąd pochodzą efekty matrycowe utrudniające analizę XRF. Szczegółowy opis tych efektów, jak również metod ich korekcji będzie omówiony w dalszej części pracy.

W zależności od typu źródła emitującego promieniowanie rentgenowskie, rozróżniamy typy fluorescencji X. Klasyczna technika fluorescencji X (XRF) wykorzystuje lampy rentgenowskie, przeważnie małej mocy wytwarzające promieniowanie o energii do kilkudziesięciu keV, często przenośne i łatwe w użyciu. W przypadku techniki RXRF (*ang. radioisotope X-ray fluorescence*) promieniowanie X lub gamma emitowane jest w wyniku rozpadu jąder izotopów promieniotwórczych. Metoda PIXE (*ang., particle induced X-ray emission*) wykorzystuje wiązkę naładowanych cząstek lub ciężkich jonów (np. protonów lub cząstek alfa) do emisji charakterystycznego promieniowania X, metoda PIGE (*ang., particle induced gamma-ray emission*) wykorzystuje natomiast takie samo źródło do emisji promieniowania gamma.

W widmie promieniowania X pochodzącego od próbki można wyróżnić dwa czynniki: charakterystyczne promieniowanie fluorescencyjne

wzbudzone w próbce oraz promieniowanie ciągłe, pochodzące głównie od rozpraszania Comptona. Na intensywność promieniowania wtórnego, czyli liczbę kwantów emitowanych z próbki w przedziale czasu znacząco wpływają takie parametry jak:

- Intensywność promieniowania pierwotnego
- Prawdopodobieństwo wzbudzenia danego pierwiastka w próbce
- Wydajność fluorescencji wzbudzanego atomu
- Parametry geometryczne (odległości między lampą, próbką i detektorem, powierzchnia napromieniana próbki)
- Masa powierzchniowa próbki
- Masowe współczynniki absorpcji promieniowania wtórnego danego pierwiastka
- Stężenie wzbudzonego pierwiastka w próbce [41-44].

Ogólne równanie opisujące zależność intensywności I_i promieniowania fluorescencyjnego X pierwiastka i w próbce o grubości t naświetlonej promieniowaniem polichromatycznym przedstawia wzór (4):

$$I_i = \frac{d\Omega}{4\pi \sin \varphi_1} Q_i q_i W_i \int_{\lambda_{min}}^{\lambda_{krawędzi}} \tau_i(\lambda) I_0(\lambda) \frac{1 - e^{-\chi(\lambda, \lambda_i) \rho t}}{\chi(\lambda, \lambda_i)} (1 + \sum_j W_j S_{i,j}) d\lambda, \quad (4)$$

gdzie: $d\Omega$ – kąt bryłowy promieniowania charakterystycznego, Q_i – czułość spektrometru na promieniowanie charakterystyczne pierwiastka i , q_i – czułość pierwiastka i , W_i , W_j – ułamki wagowe pierwiastka i oraz pierwiastka matrycy j , λ_{min} – granica krótkofalowa widma, $\lambda_{krawędzi}$ – długość fali progu absorpcji pierwiastka i , $\tau_i(\lambda)$ – współczynnik absorpcji fotoelektrycznej promieniowania pierwotnego, $I_0(\lambda)$ – intensywność promieniowania pierwotnego, $\chi(\lambda, \lambda_i)$ – masowy współczynnik osłabienia promieniowania pierwotnego i fluorescencyjnego, $S_{i,j}$ – czynnik

wzmocnienia promieniowania pierwiastka i przez promieniowanie matrycy j [45].

Intensywność promieniowania X daje informację o ilości impulsów zarejestrowanych przez licznik w jednostce czasu (*ang. counting rate*). Obecnie w detekcji promieniowania X stosuje się najczęściej detektory półprzewodnikowe, w których fotony promieniowania X wybijają elektrony z powłok w atomie uwalniając je. Jednocześnie tworzą się dziury, które razem z wolnymi elektronami migrują wewnątrz kryształu detektora w polu elektrycznym, co powoduje powstanie spadków napięć na rezystorze i powstanie złącza typu p-n. Dostępne na rynku detektory z kryształami germanowymi, krzemowymi (również domieszkowane litem), kadmowo-tellurowymi dają szerokie spektrum aplikacji ze względu na różne wydajności i rozdzielczości energetyczne tych detektorów w różnych zakresach energii, jak również inne parametry techniczne, takie jak: wymiary, grubość, SNR, rozdzielczość czasowa impulsów, rodzaj okienka, parametry elektroniczne. Najnowszym osiągnięciem w produkcji nowoczesnych detektorów promieniowania X jest stworzenie detektorów z okienkiem węglowym dającym możliwość wykrywania lekkich pierwiastków o energiach promieniowania charakterystycznego poniżej 1,5 keV takich jak: Mg, Na, Ne, F, O, N czy nawet C z wydajnością transmisji powyżej 60%. Jest to nowość, detektory te są dostępne dopiero od bieżącego roku, natomiast stosowane już od dłuższego czasu detektory Si-PIN oparte na tranzystorze FET, czy SDD (*ang. silicon drift detector*) wykorzystujące nowoczesny układ elektrod w fotodiodzie, osiągają rozdzielczość energetyczną nawet do 125 eV dla pików ^{55}Fe przy energii 5,89 keV i wydajność transmisji powyżej 80% dla energii z przedziału 2 – 14 keV. Detektory oparte na kryształach tellurku kadmu wykazują wydajność powyżej 70% dla zakresu energii: 3,3-120 keV. Parametry te zależą od grubości detektora oraz rodzaju i grubości okienka. Jednak nawet detektory stosujące najnowsze technologie nie są wolne od efektów ubocznych utrudniających analizę, takich jak obecność pików ucieczki czy

prądu upływu. Pierwsze zjawisko polega na powstawaniu dodatkowych impulsów o amplitudzie niższej od głównego lub naturalnego pików, drugie opiera się na powstawaniu dodatkowych ładunków w kryształach detektora dających wkład do prądu elektronowo-dziurowego.

Analiza fluorescencyjna nie jest prostą metodą badania składu pierwiastkowego substancji, ponieważ istnieje wiele efektów, które utrudniają analizę, tzw. efektów przeszkadzających. Należą do nich: promieniowanie interelementów, efekty matrycy (efekt absorpcji i efekt wzmocnienia), efekt granulacji (ziarnistości), efekt mineralogiczny i efekt powierzchni [41, 42, 46].

Pierwszy z nich powstaje, gdy naświetlając badaną próbkę promieniowaniem rentgenowskim, oprócz interesujących nas pierwiastków, wzbudzamy również inne pierwiastki, których promieniowanie charakterystyczne utrudnia analizę pożądanego pierwiastków (*ang. interelements*). Dzieje się to na trzy sposoby: pik serii K pierwiastków badanego i interelementu nakładają się, pik serii K pierwiastka badanego nakłada się z pikami serii L interelementów, pik promieniowania charakterystycznego badanego pierwiastka nakłada się z pikami ucieczki interelementów.

Efekt matrycy związany jest ze złożoną budową chemiczną próbki i jej wpływem na intensywność promieniowania charakterystycznego danego pierwiastka. Efekt absorpcji polega na absorpcji promieniowania fluorescencyjnego badanego pierwiastka przez pierwiastki o niewiele mniejszych liczbach atomowych. Natomiast, gdy energie promieniowania charakterystycznego pierwiastków przeszkadzających są wyższe od energii krawędzi absorpcji pierwiastka badanego, to mówimy o efekcie wzmocnienia, w wyniku którego promieniowanie fluorescencyjne pierwiastków przeszkadzających wzbudza atomy pierwiastka badanego.

W próbkach niejednorodnych występuje efekt granulacji (ziarnistości), który powoduje zmianę intensywności promieniowania charakterystycznego pierwiastka w zależności od wielkości ziaren próbki. Wielkość tego efektu zależy od liczby atomowej pierwiastka badanego, składu chemicznego matrycy, rozkładu wielkości ziaren i energii promieniowania pierwotnego.

Efekt mineralogiczny powoduje różną intensywność fluorescencji badanego pierwiastka w zależności od formy minerału, w jakiej występuje próbka. Jest związany z różną absorpcją promieniowania fluorescencyjnego przez cząsteczki minerałów mających różny skład chemiczny i odległości międzyatomowych w kryształach.

Efekt powierzchni zależy od stopnia chropowatości powierzchni badanej próbki, czyli wymiarów mikro-nierówności, wpływających na absorpcję promieniowania pierwotnego i wtórnego.

W nowoczesnych metodach analizy rentgenowskiej te efekty są minimalizowane lub korygowane. Do obecnie stosowanych metod ilościowej analizy XRF należą [45]:

a) Metody kompensacyjne

- a. Rozcieńczania
- b. Wzorca wewnętrznego
- c. Dodawanie wzorca
- d. Rozpraszania komptonowskiego

b) Metody korekcji matrycy

- a. Parametrów fundamentalnych
- b. Algorytmów współczynników wpływu
 - i. Współczynników empirycznych

ii. Współczynników teoretycznych

c) Metody minimalizacji efektów matrycy

a. Metoda cienkich próbek.

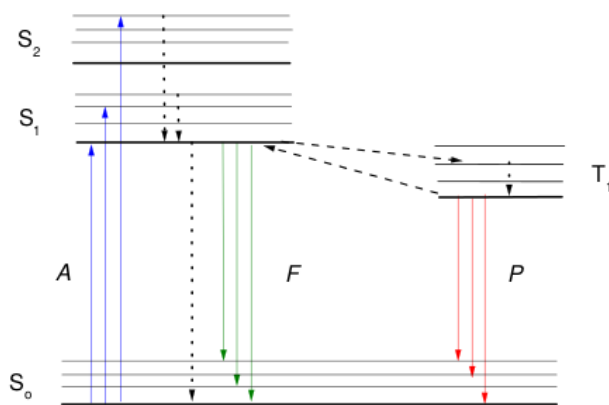
Wśród wymienionych powyżej metod, jedną z najczęściej stosowanych do próbek wielopierwiastkowych i niehomogenicznych, również w tej pracy, jest metoda parametrów fundamentalnych (FP). Wyliczenia stężeń pierwiastków tworzących próbkę opierają się na zależności intensywności promieniowania fluorescencyjnego danego pierwiastka od składu całej próbki. Twórcą równań opisujących tę zależność był Jacob Sherman. Jego równania opublikowane w 1955r., zostały następnie poprawiane przez Shiraiwa i Fujino w 1967r., Criss'a i Birks'a w 1968r. oraz Zhang'a Li-Xing w 1984r. Podstawą tej analizy jest znajomość tzw. parametrów fundamentalnych, czyli współczynników absorpcji fotoelektrycznej, masowych współczynników osłabienia promieniowania X, prawdopodobieństwa przejścia Coster-Kronig, wydajności fluorescencji, współczynników skoku absorpcji oraz względnych intensywności linii promieniowania charakterystycznego w danej serii widmowej. Analiza próbek z użyciem metody FP polega na kalibracji z użyciem jednego lub wielu standardów, czyli obliczenia współczynników kalibracyjnych, które następnie posłużą do wyznaczenia zawartości nieznanej próbki. Możliwa jest również analiza bezstandardowa, ale stosowana jest głównie w przypadku próbek jednorodnych zawierających małą liczbę pierwiastków, ponieważ bazuje ona na teoretycznych wyliczeniach czułości spektrometru na promieniowanie charakterystyczne. Metoda FP może być stosowana zarówno do badania próbek grubych, cienkich, jak i układów wielowarstwowych, jednak konieczna jest znajomość rozkładu widma promieniowania pierwotnego pochodzącego z lampy rentgenowskiej. Realizuje się to w oparciu o modele teoretyczne wyliczone m.in. przez Pella'ego (1985) i Ebel'a (1999) [47]. Stosując próbki zawierające pierwiastki niemierzalne metodą XRF (np. próbki biologiczne), trzeba

pamiętać o korekcji rozpraszania promieniowania pierwotnego na tych elementach. W przypadku takich próbek konieczna jest analiza z użyciem standardu, który ma podobną matrycę, co próbka analizowana, a pierwiastki wchodzące w jej skład występują w porównywalnym stężeniu. Takie przygotowanie analizy istotnie wpływa na jej dokładność, która jest jedną z kluczowych kwestii w badaniach XRF [45, 48].

Metoda fluorescencji X ze względu na swoje zalety, jest szeroko stosowana w świecie naukowym. W biologii i medycynie wykorzystuje się ją m.in. do badania stężenia Pb w kościach, zawartości gazów w komorach terapeutycznych stosowanych w leczeniu astmy [49], w wykrywaniu kumulacji pierwiastków śladowych w tkankach zmienionych nowotworowo [50], w zatorach i skrzepach układu krwionośnego czy w roślinach. Metoda ta służy również do badania płynów ustrojowych, np. osocza [51], ale również w biotechnologii badając granice międzyfazowe biomateriałów i żywych tkanek [52]. Technika ta jest wykorzystywana w archeologii, czy sztuce badając pokrycie metalami szlachetnymi starożytnej biżuterii, figur, posągów i wykrywając ewentualne fałszerstwa sztuki [53], a nawet w kosmetologii badając skład kremów do twarzy [54].

Fluorescencja w zakresie UV-VIS

W przeciwieństwie do fluorescencji X, fluorescencja z zakresu UV-VIS, opiera się na zjawisku wzbudzenia całej molekuly absorbującej kwant światła wg schematu Jabłońskiego (Rys. 2). Jest to związane z faktem, iż promieniowanie w zakresie UV-VIS stosowane w LIF na niższą energię, a przez to oddziałuje jedynie z zewnętrznymi powłokami.



Rys. 2. Schemat Jabłońskiego [55]

Na Rys. 2 widnieją stany elektronowe: podstawowy S_0 oraz wzbudzone: S_1 oraz S_2 , a także stany oscylacyjne wewnątrz nich. Spiny elektronów mogą być ustawione równolegle lub antyrównolegle, stąd występowanie w molekułe stanów singletowych i trypletowych. W stanie równowagi termodynamicznej molekuła znajduje się na najniższym poziomie oscylacyjnym stanu podstawowego. W wyniku absorpcji A kwantu światła odpowiadającego różnicy energii między stanami, molekuła przechodzi do wyższych stanów elektronowych, z których po bardzo krótkim czasie przechodzi do najniższego stanu oscylacyjnego w stanie S_1 . Stąd może wypromieniować kwant światła o natężeniu proporcjonalnym do gęstości prawdopodobieństwa przejścia, przechodząc do stanu podstawowego w wyniku zjawiska fluorescencji F ze stałą szybkości $k_f = 10^8 - 10^9$ 1/s. Rozkład natężeń, czyli widmo zależy od budowy wewnętrznej cząsteczki. Może ona również przejść bezpromieniście do wysokich stanów oscylacyjnych stanu S_0 w wyniku konwersji wewnętrznej i następnie szybko zrelaksować do najniższego poziomu oscylacyjnego ze stałą szybkości $k_{iss} = 10^7 - 10^9$ 1/s. Mogą nastąpić również przejścia bezpromieniste do stanów trypletowych, ale ze względu na konieczność odwrócenia spinu, następują one bardzo powoli, choć obecność ciężkich atomów, których silne pole elektryczne ułatwia odwrócenie spinu, może ułatwić ten proces. Dlatego też stałe szybkości tych przejść k_{st} mają bardzo szeroki zakres. Ze stanu trypletowego T_1 cząsteczka może przejść promieniście – wtedy zjawisko

nazywamy fosforescencją lub bezpromieniście do stanu podstawowego. Są one wolne, a ich stałe szybkości wynoszą $k_p = 10^6 - 10^1$ 1/s. Jeśli stany S i T leżą blisko siebie, cząsteczka może powrócić do stanu singletowego wzbudzonego S_1 , a następnie wyemitować kwant promieniowania w zjawisku fluorescencji opóźnionej. Widmo fluorescencji i fosforescencji przesunięte są w stosunku do widma absorpcji w stronę długofalową [56].

Omówione wyżej zjawiska zachodzące w próbce naświetlonej impulsem światła powodują zmniejszanie się w czasie liczby cząsteczek będących w stanie S_1 w wyniku przejść promienistych oraz bezpromienistych. Stąd można wyznaczyć równanie kinetycznej zmiany stężenia wzbudzonych molekuł - wzór (5).

$$\frac{d[M^*]}{dt} = -k_M[M^*] \quad (5),$$

Którego rozwiązanie wynosi:

$$[M^*](t) = [M^*]_0 e^{-\frac{t}{\tau}},$$

gdzie: M^* - liczba molekuł w stanie S_1 , $k_M = k_f + k_b$, $k_b = k_{iss} + k_{st}$, $\tau = 1/k_M$.

Parametr τ to średni czas gaśnięcia fluorescencji i jest on średnim czasem życia molekuly w stanie wzbudzonym. Zanik fluorescencji nie zawsze jest wykładniczy, a jest to związane z obecnością różnych związków, które absorbują i emitują światło lub powstawaniem nowych fluoryzujących lub niefluoryzujących molekuł. Całkowite natężenie fluorescencji $i(\lambda, \lambda')$ o długości fali λ' wzbudzanej światłem o dł. fali λ , czyli liczba kwantów fluorescencji w jednostce czasu, można opisać równaniem:

$$\int_0^\infty i(\lambda, \lambda') d\lambda = [M^*] \int_0^\infty \rho_f(\lambda) d\lambda = [M] \varepsilon(\lambda') E(\lambda') \frac{k_f}{k_M} \quad (6),$$

gdzie: ρ_f – gęstość prawdopodobieństwa przejścia molekuł ze stanu wzbudzonego do podstawowego, M – liczba niewzbudzonych molekuł, $\varepsilon(\lambda')$ – absorbanca, $E(\lambda')$ – natężenie światła wzbudzającego.

Współczynnik k_f/k_M nazywany jest wydajnością kwantową fluorescencji i określa liczbę kwantów wyemitowanych do wzbudzonych. Dla stałej wartości długości fali światła wzbudzającego λ' , mierząc rozkład $i(\lambda)$, otrzymuje się widmo fluorescencji fluoroforu M , natomiast dla stałej długości fali fluorescencji λ , zmieniając λ' , otrzymuje się widmo wzbudzenia $i(\lambda')$. Intensywność fluorescencji jest proporcjonalna do stężenia molekuł fluoroforu M [56].

Za pomocą fluorescencji można obserwować związki fluoryzujące wprowadzone z zewnątrz do układu i przyłączające się do biomolekuł, co jest wykorzystywane w diagnostyce i terapii fotodynamicznej (PDD, PDT). Właściwości fluorescencji tych substancji związane są z właściwościami strukturalnymi cząsteczek, z którymi się połączyły. Pierwszych pomiarów z wykorzystaniem takich sond luminescencyjnych dokonał Gregorio Weber, który określał wielkość białek mierząc polaryzację fluorescencji doczepionych do nich fluoroforów. Wśród egzogennych fluoroforów można wyróżnić: pochodne chloryny i porfiryn (texapiryna lutetu), sytox, fotoporfiryna IX czy substancje z rodziny benzofenotiazyny (EtNBS). Drugą grupę tworzą tzw. fluorofory endogenne, które zawarte są w tkankach organizmów żywych i powodują powstanie autofluorescencji. Należą do nich m.in. składniki białek (tryptofan, tyrozyna, fenyloalanina), porfiryny, koenzymy (FAD - dinukleotyd flawinoadeninowy, dinukleotyd nikotynoaminoadeninowy – NADH, fosforan dinukleotydu nikotynoaminoadeninowego – NADPH, mononukleotyd flawinowy - FMN), pochodne witaminy B6, kolagen, elastyna. Tab. 1 przedstawia najczęściej występujące w tkankach ludzkich endogenne fluorofory wraz z długościami fali wzbudzenia i emisji (57, 58, 59).

Fluorofor	Maksimum wzbudzenia (nm)	Maksimum emisji (nm)
Porfiry	405, 407, 400-450, 630	590, 610, 620, 635, 675, 690, 705
Aminokwasy		
Tryptofan	280, 295	350, 340-350, 345
Tyrozyna	275	300, 340
Fenylalanina	260	280
Białka strukturalne		
Kolagen	270, 325, 330, 335	380, 390-405, 395, 400, 405, 460-490
Wiązania poprzeczne kolagenu	370	340, 400, 420, 460
Elastyna	290, 325, 350, 360	500, 500-540
Wiązania poprzeczne kolagenu	390-420, 400, 420-460	
Koenzymy		
FAD, Flawiny	430, 450	515, 535, 550
NADH	290, 340, 350, 365	440, 450, 455, 460
NADPH	336	464
Lipidy		
Fosfolipidy	436	540, 560
Lipofuscyna	340-395	430-460, 540
Ceroid	340-395	430-460, 540
Witaminy		
Witamina A	327	510
Witamina K	335	480
Witamina D	390	

Tab. 1. Endogenne fluorofory występujące w tkankach ludzkich

Bardzo ważną metodą spektrometryczną wykorzystującą promieniowanie z zakresu UV-VIS jest fluorescencja wzbudzana promieniowaniem laserowym (LIF) [60, 61]. Ze względu na wykorzystanie lasera do wzbudzenia molekuly, który emituje promieniowanie spójne o jednej, ustalonej długości fali, możliwe jest selektywne pobudzanie molekuł, których pasmo wzbudzenia znajduje się w zakresie emisji lasera.

W ten sposób można określić, jakie fluorofory znajdują się w badanym materiale.

Różnice w widmie wzbudzenia, widmie emisji fluorescencji, czasie jej gaśnięcia czy polaryzacji między tkankami zdrowymi oraz chorymi, np. nowotworowymi, są wykorzystywane w diagnostyce wielu schorzeń, m.in. śledzeniu komórek nowotworowych, przerzutów, angiogenezie, miażdżycy [62-67]. Różnice te wynikają ze zmiany koncentracji fluoroforów w tkankach chorych, ale również z zaburzonych własności fluoroforów związanych ze zmienionym mikrośrodowiskiem [68]. Ze względu na fakt obecności macierzy organicznej w kościach i zębach, technikę LIF można zastosować również do badania tych tkanek. W tym przypadku komponenty wykazujące fluorescencję to głównie: kolagen, elastyna, enzymy, fosfolipidy, czy porfiryny.

Zastosowanie techniki LIF nie ogranicza się jedynie do medycyny. W ostatnich latach prowadzone są badania fotodegradacji polimerów (HDPE, polietylen wysokiej gęstości) [69], czy wykrywanie nieczystości na filmach optycznych [70].

Radiografia cyfrowa

Techniki obrazowania cyfrowego zapoczątkowane przez Hounsfielda stosowane są obecnie na całym świecie. Radiografia cyfrowa w stomatologii stosowana jest od 1987r., w którym dr Mouyen opatentował system cyfrowego rentgenowskiego obrazowania zębów i tkanek wyrostka zębodołowego. Ta nowoczesna metoda obrazowania rentgenowskiego oparta jest na pomiarze współczynnika absorpcji promieniowania X, zgodnie z prawem absorpcji Beera:

$$I = I_0 e^{-\mu x} \quad (7),$$

gdzie: I – natężenie promieniowania X po przejściu przez absorbent, I_0 - natężenie pierwotnego promieniowania X, μ – liniowy współczynnik absorpcji promieniowania X, x – grubość absorbenta.

Najczęściej stosuje się masowy współczynnik absorpcji, który wylicza się dzieląc liniowy współczynnik absorpcji przez gęstość absorbenta.

Zastosowanie czujnika CCD (*ang. charge coupled device*) o małej grubości i dużej rozdzielczości oraz oprogramowania komputerowego umożliwia szybką akwizycję obrazu i możliwość obróbki otrzymanego obrazu cyfrowego, ale przede wszystkim redukuje dawkę promieniowania rentgenowskiego otrzymanego przez pacjenta do 95% w porównaniu do rentgenodiagnostyki konwencjonalnej. Cyfryzacja danych oraz zastosowanie specjalistycznego oprogramowania do analizy obrazów, umożliwia przetwarzanie otrzymanych obrazów cyfrowych, np. wzmocnienie kontrastu, pomiar odległości, kątów, gęstości optycznej, filtracji, subtrakcji i wielu innych. Pomiaru gęstości badanego materiału dokonuje się mierząc poziom szarości poszczególnych pikseli na obrazie cyfrowym. W zależności od typu obrazu, może to być skala 256-bitowa, 2048-bitowa lub inna [71]. Wymiary detektora oraz dostosowanie parametrów badania do pacjenta, umożliwia wykonanie zdjęć nawet małych obiektów.

Obecnie radiografia cyfrowa jest szeroko wykorzystywana nie tylko w diagnostyce medycznej, ale również w badaniach naukowych. Metodę tę wykorzystuje się m.in. w badaniach przeszczepów własnopochodnych żuchwy [72, 73], badaniach wpływu leków przeciwzapalnych na kości szczurów [74], badania biokompatybilności zdemineralizowanej zębiny wprowadzonej do kości królików [75].

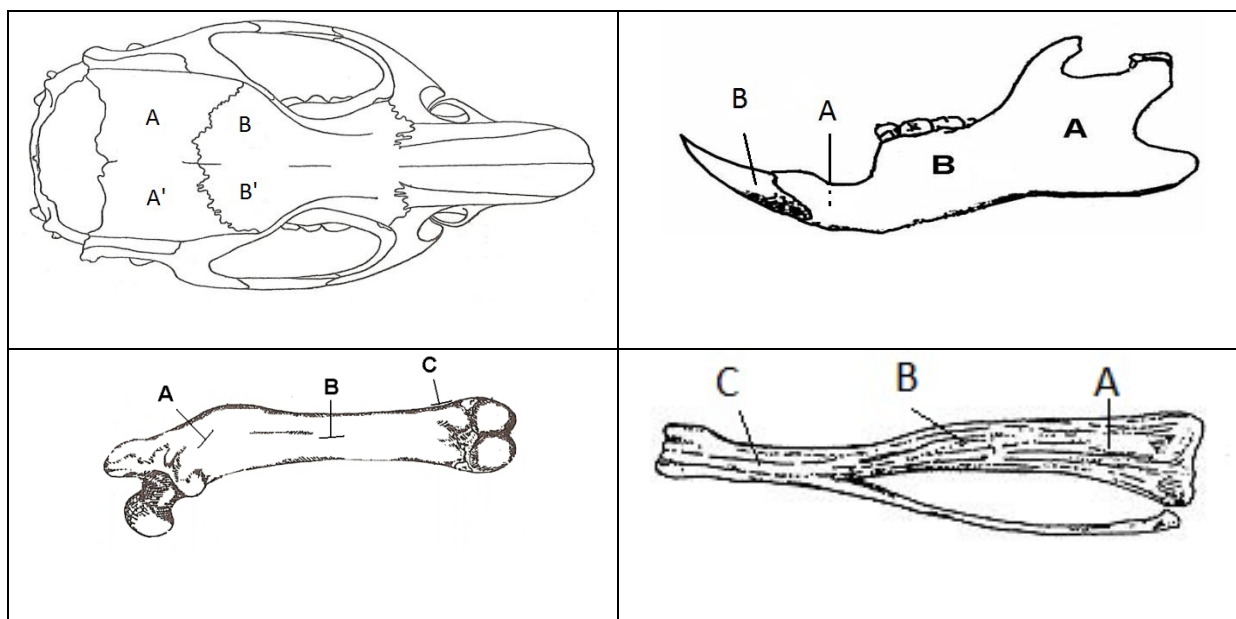
MATERIAŁ I METODYKA

MATERIAŁ BADAWCZY

W pracy doktorskiej badano kości (żuchwy, czaszki, kości udowe i piszczelowe) oraz zęby (siekacze górne i dolne) noworodków szczurzych rasy Wistar w wieku 7, 14 i 28 dni. Kości pochodziły od szczurów podzielonych na trzy grupy badawcze: Kontrola, *Indinawir* i *Zidowudyna*. Grupa kontrolna zawierała kości szczurów, których matkom podawano w czasie ciąży 0,9% NaCl. Natomiast dwie pozostałe grupy stanowiły kości noworodków, których matki przyjmowały w czasie ciąży odpowiednio *indinawir* w dawce 200mg/kg masy ciała oraz *zidowudynę* w dawce 500mg/kg masy ciała. Leki te były podawane dootrzewnowo. Hodowla szczurów była przeprowadzona w Katedrze i Zakładzie Farmakologii na Wydziale Farmaceutycznym Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Sosnowcu. W docelowym dniu życia dokonano sekcji młodych szczurów zgodnie ze standardem ustanowionym przez Komisję Bioetyczną Śląskiego Uniwersytetu Medycznego (uśpienie szczurów eterem i przecięcie przepony, co gwarantowało szybką i bezbolesną śmierć), która wydała pozwolenie na przeprowadzenie eksperymentu o numerze 47/03. Po sekcji kości zostały wyekstrahowane, kilkakrotnie oczyszczone z tkanek miękkich, moczone w wodzie destylowanej i na końcu osuszone na powietrzu i wyprażone w piecu o temperaturze 300⁰C. W procesie przygotowania próbek nie używano żadnych odczynników chemicznych mogących modyfikować skład lub strukturę kości.

Pomiarów fizycznych dokonano na kościach pochodzących od min. 6 osobników z każdej grupy wiekowej w każdej grupie badawczej, co daje łącznie 54 osobników. W przypadku kości symetrycznych (żuchw, kości udowych, kości piszczelowych, siekaczy górnych i siekaczy dolnych) badano osobno kości lewe i prawe, i jeśli analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic między nimi, ich wyniki uśredniono. W celu oceny, czy analizowane parametry są różne w różnych obszarach kości,

pomiary były wykonane w obszarach pomiarowych zaprezentowanych na Rys. 3.



Rys. 3. Obrazy mierzonych kości z zaznaczonymi obszarami zainteresowania: (a) kość ciemieniowa (obszar A i A') i czołowa (obszar B i B') pokrywy czaszki, (b) gałąź (obszar A) oraz trzon (obszar B) żuchwy oraz część wewnętrzna siekacza (obszar A) i część zewnętrzna siekacza (obszar B), (c) koniec bliższy (obszar A), trzon (obszar B) i koniec dalszy (obszar C) kości udowej, (d) koniec bliższy (obszar A), trzon (obszar B) i koniec dalszy (obszar C) kości piszczelowej

Na powierzchni żuchw wybrano obszary A i B, które obejmowały odpowiednio: gałąź żuchwy występującą w okolicy stawu skroniowo-żuchwowego i trzon żuchwy występujący bliżej zębów trzonowych. Na czaszce badano kości ciemieniowe (oznaczone jako A i A') oraz kości czołowe (oznaczone jako B i B'). Na kościach długich (udowych i piszczelowych) wyszczególniono obszary: w pobliżu końca bliższego, trzon oraz w pobliżu końca dalszego oznaczone odpowiednio: A, B, C. Na siekaczach dolnych i górnych wyróżniono natomiast część schowaną wewnątrz żuchwy (obszar A) oraz część zewnętrzną (obszar B). Przekrój poprzeczny szczurzego siekacza uwiadcza zębinę wypełniającą większość część zęba oraz szkliwo, które jednak znajduje się jedynie w zewnętrznej warstwie w części przedniej zęba.

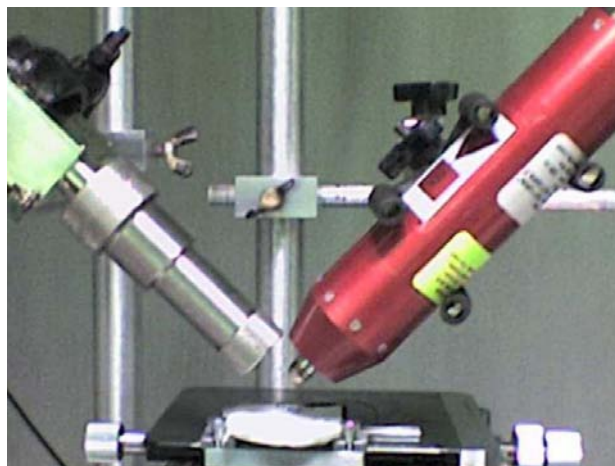
Wybór powyższych obszarów badawczych był podyktowany próbą sprawdzenia, czy występują różnice w składzie poszczególnych części kości, jak również koniecznością pomiarów płaskich powierzchni. W związku z tym na powierzchni siekaczy badano tylko obszary zawierające zębiny.

Model zwierzęcy z wykorzystaniem szczura rasy Wistar został wybrany, ponieważ budowa, struktura kości oraz procesy biochemiczne w nich zachodzące są podobne do tych występujących u ludzi, a jednocześnie umożliwia on przeprowadzenie badań in vitro.

TECHNIKI POMIAROWE

XRF

Badania składu mineralnego kości były przeprowadzone z użyciem układu do fluorescencji wzbudzanej promieniowaniem rentgenowskim z dyspersją energii (EDXRF, *ang. energy dispersive X-ray fluorescence*) produkcji firmy Amptek Inc (Rys. 4).



Rys. 4. Układ pomiarowy do badania fluorescencji X

Źródło promieniowania X stanowiła miniaturowa lampa rentgenowska Eclipse III z anodą transmisyjną ze srebra i okienkiem berylowym o maksymalnej mocy 3 W. Układ detekcyjny zawierał detektor CdTe z okienkiem berylowym o rozdzielczości energetycznej 500 eV dla pików Mn- K_{α} i rozdzielczości czasowej (*ang. peaking time*) 7,2 μ s połączony ze źródłem zasilania i wzmacniaczem modulującym (*ang. shaping amplifier*) PX2T-CdTe o stałej czasu modulowania impulsu 3 μ s. Wzmacniacz na wyjściu podawał sygnał o kształcie trójkątnym z rekonstrukcją linii bazowej, usuwaniem pików sumowania, różnicowaniem czasu narastania (RTD, *ang. rise time discrimination*). Sygnał był następnie przekazywany do analizatora wielokanałowego niskiej mocy (<300 mW) MCA-8000A (MCA, *ang. multichannel analyzer*) o czasie konwersji mniejszej niż 5 μ s, co dawało ponad 200 000 zliczeń na sekundę. Analizator wykazywał małą nieliniowość różnicową (< $\pm 0,6\%$) i całkową (< $\pm 0,02\%$). Minimalny czas trwania impulsu przetworzonego przez analizator wynosi 250 ns. Widma

energetyczne badanych próbek były wyświetlane w programie ADMCA v2.0, w którym dokonano analizy jakościowej, natomiast analiza ilościowa stężeń pierwiastków w próbkach była przeprowadzona z użyciem programu FP-XRS v4.9. W wyniku analizy otrzymano wartości stężeń pierwiastków występujących w kościach.

Pojedynczy pomiar był dokonany przy napięciu lampy 20kV, natężeniu 10 μ A, w czasie 180s. Napięcie zasilające zostało wybrane z powodu zakresu energii promieniowania charakterystycznego pierwiastków występujących w próbkach, tj. do 20keV. Kąty między lampą RTG a próbką oraz próbką a detektorem wynosiły po 45⁰, a odległości odpowiednio: 3.8 cm i 63 cm.

W celu zogniskowania obszaru pomiarowego przed detektorem zamontowano kolimator wolframowy o średnicy 1000 μ m. Pomiary były przeprowadzone w powietrzu, w temperaturze pokojowej i przy normalnym ciśnieniu.

LIF

Zawartość składników organicznych kości badano metodą fluorescencji wzbudzanej promieniowaniem laserowym o długości fali 407nm z laserem półprzewodnikowym z azotku galu. Układ pomiarowy zaprezentowany jest na Rys. 5.



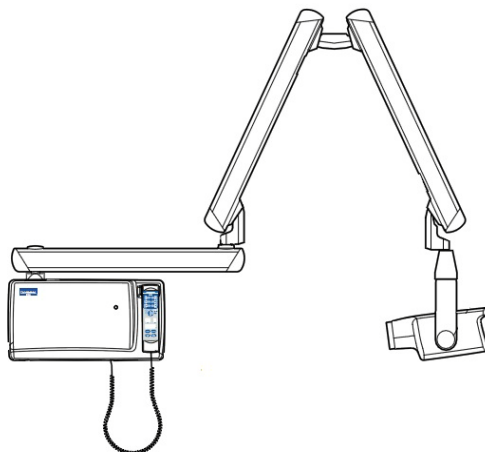
Rys. 5. Układ pomiarowy do badania fluorescencji LIF

Taka długość fali światła laserowego pozwala zmniejszyć wielkość plamki wiązki laserowej, a przez to uzyskać większą precyzję pomiarów. Próbki były umieszczane w odległości 1 mm od światłowodu o przekroju 1.8 mm. Średnia moc lasera wynosiła 10 mW, a gęstość mocy 2 mW/cm². Uzyskane widmo zawierało 10 uśrednionych pojedynczych pomiarów zebranych w ciągu 5 s. Widmo fluorescencji było mierzone w zakresie 407-814 nm z użyciem programu LESA-6. Analizie poddano widma fluorescencji, jak również wartości intensywności fluorescencji w maksimum pików. W celu porównania intensywności fluorescencji LIF, dla każdego widma utworzono linię bazową o dwóch punktach.

Badania fluorescencji X oraz fluorescencji wzbudzanej laserowo zostały przeprowadzone w Zakładzie Fizyki Medycznej Instytutu Fizyki Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach.

RADIOGRAFIA CYFROWA

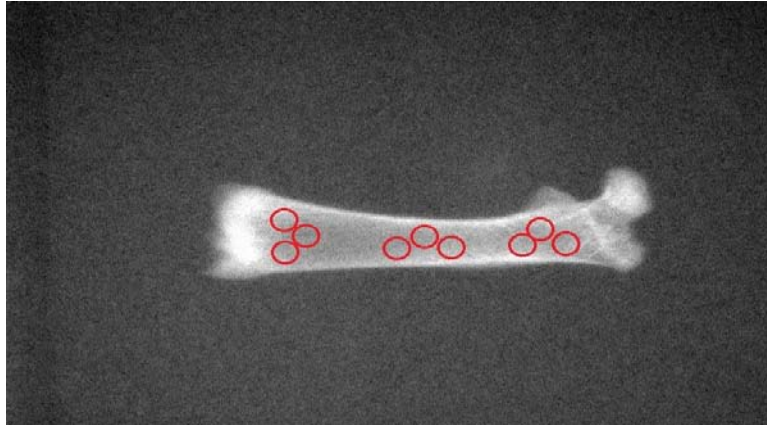
Zdjęcia rentgenowskie kości były wykonane we współpracy z Instytutem Stomatologii w Katowicach, który udostępnił aparaturę pomiarową (Rys. 6).



Rys. 6. Układ pomiarowy radiografii cyfrowej

Wykorzystano stomatologiczny punktowy aparat rentgenowski do zdjęć wewnątrzustnych Intra wyprodukowany przez firmę Planmeca Inc. z lampą rentgenowską Toshiba D-0711SB z filtrem o grubości 1 mm Al, czujnikiem typu CCD ze scyntylatorem ProSensor oraz oprogramowaniem do akwizycji i analizy Dimaxis 3.0. Cyfrowe zdjęcia kości były wykonywane przy napięciu 60 kV i natężeniu 8 mA. Czas pojedynczej akwizycji wynosił 0.08 s. Zdjęcia były zapisywane w standardzie DICOM. Przed każdą serią pomiarową danego dnia dokonywano kalibracji wykonując zdjęcie tła i sprawdzając, czy jest ono takie same dla każdej próbki. W ten sposób uniknięto zaburzeń wartości nie pochodzących od próbek. W celu analizy ilościowej, dokonano pomiaru średniej wartości poziomu szarości ustalonych ROI na obszarze każdej kości w programie ImageJ. Wybrano obszary ROI (*ang. region of interest*) o średnicy 1 cm dla kości szczurów 14- i 28-dniowych oraz 0.6 cm dla kości szczurów 7-dniowych.

Rys. 7 przedstawia przykładowe zdjęcie rentgenowskie piszczeli szczura 28-dniowego, na powierzchni której umieszczono obszary ROI.



Rys. 7. Przykładowa kość piszczelowa 28-dniowego szczura kontrolnego z zaznaczonymi obszarami ROI

Zmierzone wartości poziomu szarości dają informację o gęstości kości ze względu na zależność stopnia pochłaniania promieniowania X przez absorbent od liczby atomowej Z materiału. Wartość najmniejsza 0 stanowią piksele czarne w miejscach, w których absorpcja promieniowania X nie nastąpiła, wartość maksymalna 2048 odpowiada pikselom w kolorze białym dla 100% absorpcji promieniowania X.

ANALIZA DANYCH

W wyniku przeprowadzonych badań uzyskano 4106 widm fluorescencji X i odpowiadających im tabel stężeń składników mineralnych, 4106 widm fluorescencji wzbudzanej promieniowaniem laserowym oraz 522 cyfrowe zdjęcia rentgenowskie i 4106 pomiarów poziomów szarości. Każdy z pomiarów (fluorescencji X, fluorescencji LIF i pomiarów poziomu szarości) był dokonany trzykrotnie z każdego z obszarów pomiarowych kości omówionych w części „Materiał badawczy” z trzech sąsiadujących ROI. W ten sposób uzyskano obraz makroskopowy minimalizując błędy wynikające z niejednorodności materiału. Ze względu na fakt, iż badano materiał biologiczny, który cechuje się dużą zmiennością osobniczą oraz ze względu na istotną wagę procesu przygotowania danych przed przystąpieniem do właściwej analizy oraz dużą ilość danych, szczególną uwagę zwrócono na oczyszczenie danych i ich normalizację. Uzyskane wyniki wymagały odpowiednich analiz.

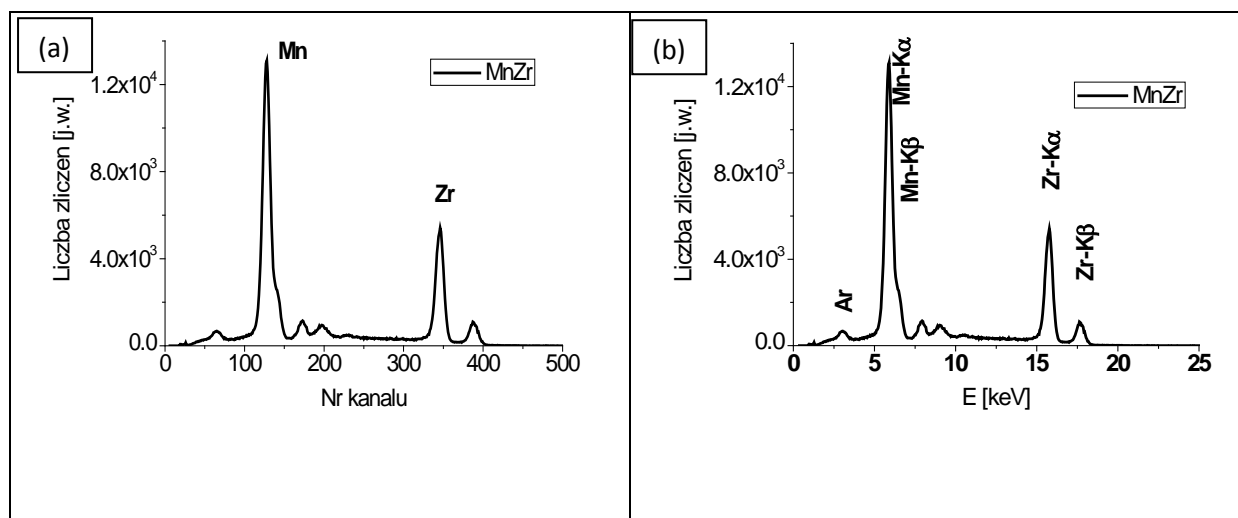
Wszystkie zebrane widma były analizowane w programie Origin v7.1, analizę statystyczną wykonano w programie Statistica v10. W celu doboru odpowiedniej metody szczegółowej analizy statystycznej, dla wszystkich parametrów uzyskanych w eksperymencie wykonano test Shapiro-Wilka celem oceny normalności rozkładu oraz test Levene’a celem określenia jednorodności wariancji. Jeśli dane spełniały założenia testów parametrycznych, zastosowano test T-Studenta do porównań dwóch średnich oraz test ANOVA do porównań wielokrotnych. W przypadku braku spełnienia powyższych warunków, stosowane były testy nieparametryczne: U Manna-Witney’a dla porównań dwóch średnich i Walda-Wolfowitza dla porównań wielu średnich. Różnice z poziomem istotności $p < 0,05$ traktowano jako istotne statystycznie.

WYNIKI BADAŃ I ICH ANALIZA

Wyniki badań wykonane techniką XRF

Na początku dokonano kalibracji spektrometru, kalibracji przy pomocy standardu kości oraz ustalono prawidłowe parametry analizy ilościowej z wykorzystaniem metody parametrów fundamentalnych.

Celem kalibracji energetycznej jest przyporządkowanie numerom kanałów odpowiedniej wartości energii promieniowania charakterystycznego. Osiąga się go dokonując pomiaru próbki o znanym składzie, przy czym ważne jest, aby próbka zawierała pierwiastki w podobnym zakresie energetycznym, co nieznana próbka, a piki były oddalone o co najmniej 10 keV i miały odpowiednio wysoką liczbę zliczeń. Widma próbki zawierającej Mn i Zr przed i po kalibracji energetycznej przedstawione są na Rys. 8.



Rys. 8. Widma fluorescencji X przed kalibracją energetyczną (a) i po kalibracji energetycznej (b)

Część parametrów koniecznych do przeprowadzenia analizy ilościowej, takich jak geometria układu, czas trwania pojedynczych pomiarów itp., wynikała z warunków przeprowadzonego eksperymentu i została omówiona w sekcji „Metodyka”. Druga grupa parametrów wynikała z konstrukcji elementów układu pomiarowego: źródła, detektora, analizatora wielokanałowego, wzmacniacza. Dane te uzyskano na prośbę

od producenta układu pomiarowego. Ostatnią grupę stanowiły parametry, które należy samodzielnie dostosować, by były optymalne dla konkretnej analizy.

Kości to materiał biologiczny, który jest niehomogeniczny i zawierający pierwiastki niemierzalne w analizie XRF, takie jak O, H, N, C, stąd koniecznym było przeprowadzenie analizy ze standardem. Początkowo wykorzystano standard wapienia KH-2, którego skład jest zbliżony do składu kości i przedstawiony w tab. 2.

Związek	Stężenie	
	[%]	[ppm]
SiO ₂	8,67	
TiO ₂	0.13	
Al ₂ O ₃	2.35	
Fe ₂ O ₃	0.86	
FeO	0.30	
MnO	0.084	
MgO	0.67	
CaO	47.6	
Na ₂ O	0.11	
K ₂ O	0.44	
CO ₂	37.5	
Zn		24

Tab. 2. Certyfikowana zawartość pierwiastków w materiale referencyjnym wapienia KH-2

Opierając się na tym związku przeprowadzono początkowo analizę składu kości szczurów. Jednakże, ponieważ wapień nie zawiera w swoim składzie P, który w dużym stężeniu znajduje się w kościach, zakupiono certyfikowany standard referencyjny kości SRM Bone Meal w Narodowym

Instytucie Materiałów Referencyjnych NIST w USA. Skład materiału referencyjnego podany jest w tab. 3.

Pierwiastek	Stężenie	Niepewność	Jednostka	Pierwiastek	Stężenie	Jednostka
Stężenia certyfikowane:				Stężenia niecertyfikowane:		
Ca	26.58	0.24	wt%	Si	(<0.02)	wt%
Mg	0.466	0.017	wt%	Na	(0.5)	wt%
P	12.30	0.19	wt%	C	(18.6)	wt%
Fe	99	8	ppm	Al	(<1)	ppm
Pb	1.335	0.014	ppm	As	(0.006)	ppm
K	412	4	ppm	Cd	(0.003)	ppm
Sr	264	7	ppm	Cu	(0.8)	ppm
Zn	147	16	ppm	F	(800)	ppm
				Mn	(1)	ppm
				Se	(0.13)	ppm

Tab. 3. Certyfikowana zawartość pierwiastków w materiale referencyjnym kości SRM Bone Meal

Analiza FP z użyciem standardu referencyjnego o znanym składzie pierwiastkowym polega na zmierzeniu widma tego standardu, wyznaczenia w wyniku analizy ilościowej współczynników kalibracyjnych, za pomocą których dokonuje się przeliczenia intensywności widm nieznaney próbki na wartości stężeń jej poszczególnych składników. Taka analiza nie jest trywialna, ponieważ oprócz doboru właściwych parametrów, należy uwzględnić dodatkowe zjawiska przeszkadzające w analizie, opisane w części teoretycznej dotyczącej metody XRF, takie jak:

efekty matrycy, powstawanie pików ucieczki, pików sumowania, występowanie tła energetycznego itp.

W związku z efektami zaburzającymi analizę, podczas przetwarzania widma energetycznego, należy je wygładzić wykorzystując odpowiednie filtry, usunąć piki narastania, ucieczki, tło, piki komptonowskie i na końcu dokonać dekonwolucji.

W wyniku efektu matrycy następuje wzmocnienie linii jednego pierwiastka kosztem drugiego. W próbce kości taka sytuacja może mieć miejsce, ponieważ występuje jednocześnie mangan o energii wiązania 6.539 keV na powłoce K i żelazo o energii promieniowania charakterystycznego 7.058 keV.

Czas martwy układu elektronicznego przyczynia się do sumowania energii dwóch pików, które pojawiają się w krótkich odstępach czasu [76]. Otrzymane widmo może być również zniekształcone wskutek tzw. efektu Fano opisującego fluktuacje związane z generacją ładunków oraz szumu elektronicznego tworzące się na wejściu przedwzmacniacza. Efekty te mogą powodować interferencję spektralną objawiającą się nakładaniem pików. Stąd konieczność korekcji widma.

Dodatkowe wzbudzenia mogą powstać w detektorze powodując powstanie fotopików od atomów zawartych w materiale detektora. To powoduje powstanie promieniowania charakterystycznego tych atomów, które mogą opuścić detektor i być błędnie zaklasyfikowane przez układ elektroniczny, jako pochodzące z próbki. Uciekające elektrony tworzą widmo ciągłe z minimum energetycznym w pikie ucieczki. Jednocześnie promieniowanie X oddziałujące z warstwą martwą na powierzchni detektora (czyli taką, w której nośniki nie są zbierane), powoduje powstawanie wtórnego promieniowania charakterystycznego w obszarze aktywnym. Zastosowana w detektorze CdTe dyskryminacja czasu narastania RTD minimalizuje zniekształcenia widma z powodu efektu „hole tailing”, co powoduje polepszenie jakości widma [77].

Korekcja pików sumowania oraz pików ucieczki powoduje ich usunięcie oraz dodatnie ich liczby zliczeń do fotopików, co skutkuje zniesieniem interferencji i poprawnym zliczeniem impulsów.

Wygładzanie wspomaga rozpoznawanie tła i wydzielenia z niego pików promieniowania charakterystycznego. W tym celu zastosowano potrójny filtr gaussowski. Zastosowanie filtra dolnoprzepustowego podczas usuwania tła pozwala zamodelować wolno zmieniające się tło, które potem jest usuwane.

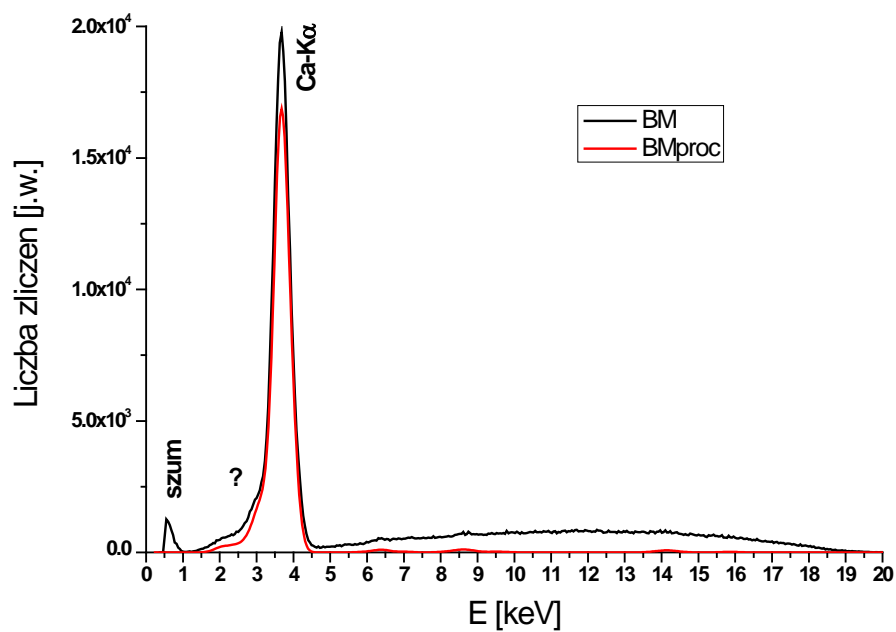
Pomiary kości wykonywane były w powietrzu, a oddziaływanie promieniowania X z atomami pierwiastków znajdujących się na drodze między próbką a detektorem przyczynia się do powstania dodatkowych interferencji środowiskowych. Odcięcie pustego widma pozwala usunąć artefakty niezmieniające się między pomiarami, jak np. Ar z powietrza, piki rozpraszania z lampy RTG czy zanieczyszczenia z układu pomiarowego.

Dodatkowo rozpraszanie Compton'a i Rayleigh'a powoduje powstanie ciągłego promieniowania. W celu usunięcia pików komptonowskich estymuje się intensywność pików pochodzących z rozpraszania komptonowskiego i Rayleigh'a, co wpływa na parametry stosowane podczas dekonwolucji. By program mógł wyseparować piki w wyniku dekonwolucji, należy podać pierwiastki, które spodziewamy się zastać w próbce wraz z głównymi liniami promieniowania charakterystycznego. Następnie stosuje się jeden z trzech modeli: gaussowski, referencyjny lub całkujący. W pracy zastosowano pierwszy, jako że jest najbardziej optymalny w większości przypadków i zalecany przez producenta. Pozostałe dwa stosuje albo do wysokich energii, albo w przypadku prostych widm.

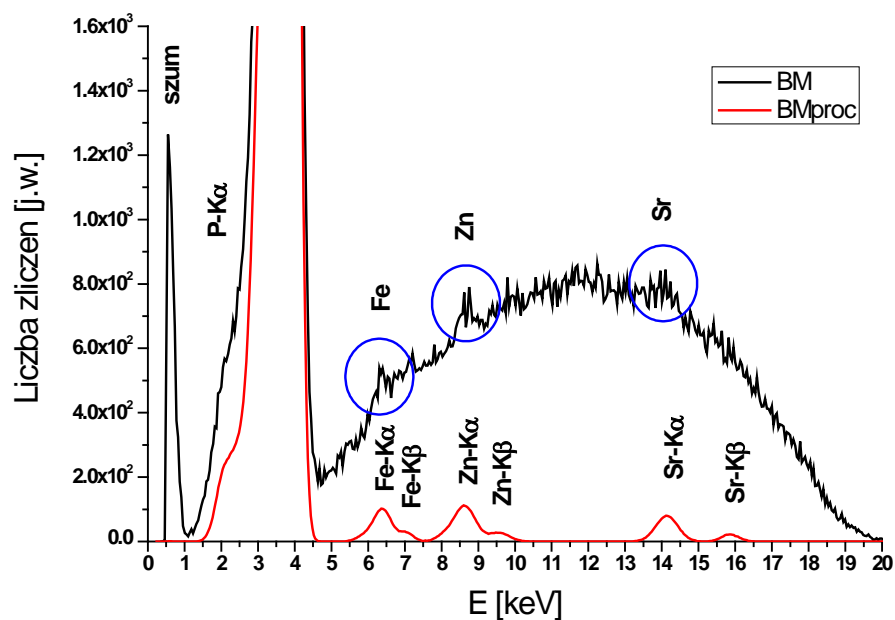
Zastosowanie dekonwolucji nieliniowej pozwoliło na ustawienie energii, szerokości pików i stosunków widmowych w ustalonych granicach w celu lepszego ich dopasowania [76].

W celu otrzymania rzetelnych stężeń mierzonych pierwiastków, te niemierzalne techniką XRF z powodu zbyt małej energii promieniowania charakterystycznego są uznawane za stałe w składzie i należy podać ich przewidywane stężenie w próbce. W związku z tym, wpisano na wejściu danych stężenia pierwiastków występujących w kościach, ale niepodlegających analizie, mających energie promieniowania charakterystycznego poniżej 2 keV, takie jak: C, O, F, Na, Mg, Al, Si zgodnie z koncentracją tych pierwiastków w próbce standardu referencyjnego SRM Bone Meal.

W wyniku przeprowadzonej na tym etapie analizy uzyskuje się współczynniki kalibracyjne, które w następnym kroku wykorzystuje się do wyliczenia stężeń składników próbki nieznanej. Bardzo istotne jest, by ten etap analizy został przeprowadzony prawidłowo, ponieważ rzutuje on na całą późniejszą analizę. W związku z tym w pracy przeprowadzono walidację opracowanej metody. Po ustaleniu najbardziej optymalnych parametrów, wykonano kalibrację z wykorzystaniem wzorca BM (Bone Meal). Wykresy poniżej przedstawiają widma BM przed oraz po przetworzeniu w całości (Rys. 9) oraz powiększony obszar, na którym widać wykryte pierwiastki: Ca, P, Fe, Zn i Sr do 1600 zliczeń (Rys. 10).

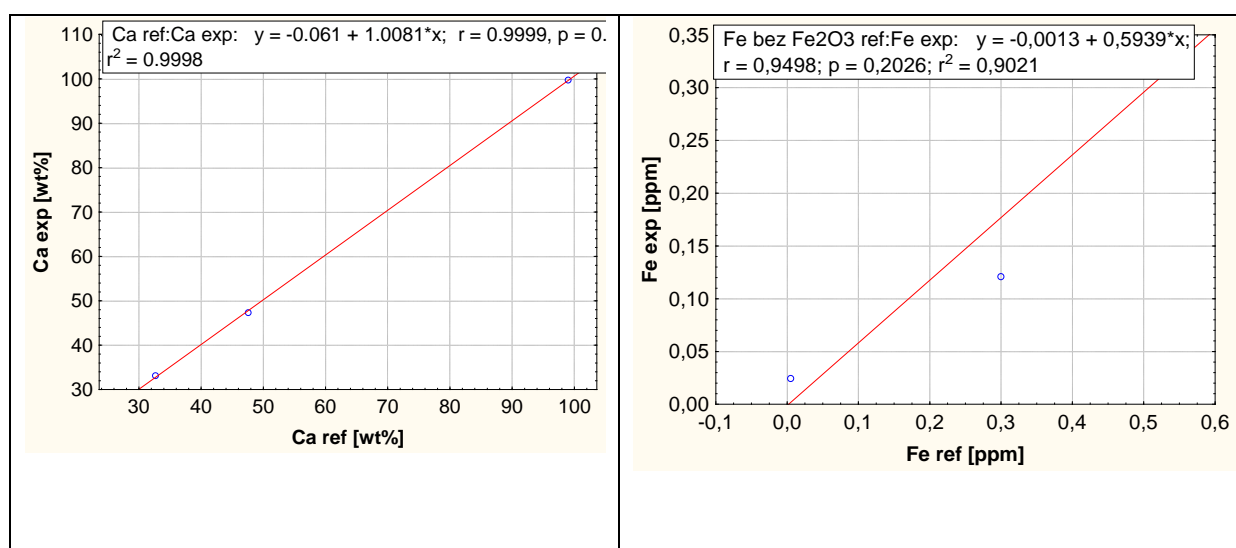


Rys. 9. Widmo fluorescencji X próbki referencyjnej Bone Meal przed i po przetworzeniu



Rys. 10. Powiększony zakres widma fluorescencji X do 1600 zliczeń

W celu walidacji zastosowanej metody, wyznaczono stężenia składników innych próbek o znanej zawartości i podobnej matrycy. Dysponowano próbką wapienia KH-2 zawierającego m.in. Al, Fe, Mn, Ca, Zn, próbką $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ zawierającą Ca, Pb, Fe oraz próbką koncentratu apatytowego CTA-AC-1 zawierającą Ca, Cu, Mn, Zn, Al, Fe, Sr. Po wielu próbach doboru najbardziej optymalnych parametrów analizy, uzyskano parametry, które są zebrane w tab 5. Korelacje między stężeniami Ca i Fe znanymi a wyliczonymi w wyniku analizy z zastosowaniem tychże parametrów w próbkach walidacyjnych przedstawia rys. 11.



Rys. 11. Wykres korelacji stężeń uzyskanych w eksperymencie względem stężeń certyfikowanych dla próbek walidacyjnych Ca (a) oraz Fe (b)

Wyznaczony współczynnik korelacji liniowej Pearsona powyżej 0.9 dla obu pierwiastków potwierdza prawie pełną korelację i zgodność wyznaczonych stężeń z wartościami znanymi. Dla Zn i Sr nie wykonano wykresów, ponieważ tylko dwie z dostępnych próbek walidacyjnych zawierały Zn i jedna Sr, jednak wyliczone stężenia w tych próbkach również potwierdzają poprawność analizy tych pierwiastków. Ze względu na rozdzielczość energetyczną stosowanego detektora.

Najbardziej optymalne w stosowanej w pracy analizie okazały się parametry przedstawione w tab. 5.

Grupa parametrów	Parametr	Wartość	Jednostka
Parametry detektora	Typ	CdTe	
	Powierzchnia	25	mm ²
	Grubość	1	mm
	Grubość warstwy złota	150	nm
	Grubość warstwy martwej	0.15	um
	Typ okienka	Be	
	Grubość okienka	250	µm
	Grubość pokrywy węglowej	1000	nm
	Rozdzielczość energetyczna dla pików Mn-Kα	500	eV
Geometria	Kąt padania promieniowania X	45°	
	Kąt odbicia	45°	
	Kąt rozpraszania	90°	
	Odległość źródła od próbki	3.8	mm
	Odległość próbki od detektora	63	mm
Źródło promieniowania X	Typ źródła	Transmisyjne	
	Model promieniowania źródła	Pella	
	Materiał anody	Ag	
	Grubość anody	4	µm
	Kąt padania promieniowania pierwotnego	90°	

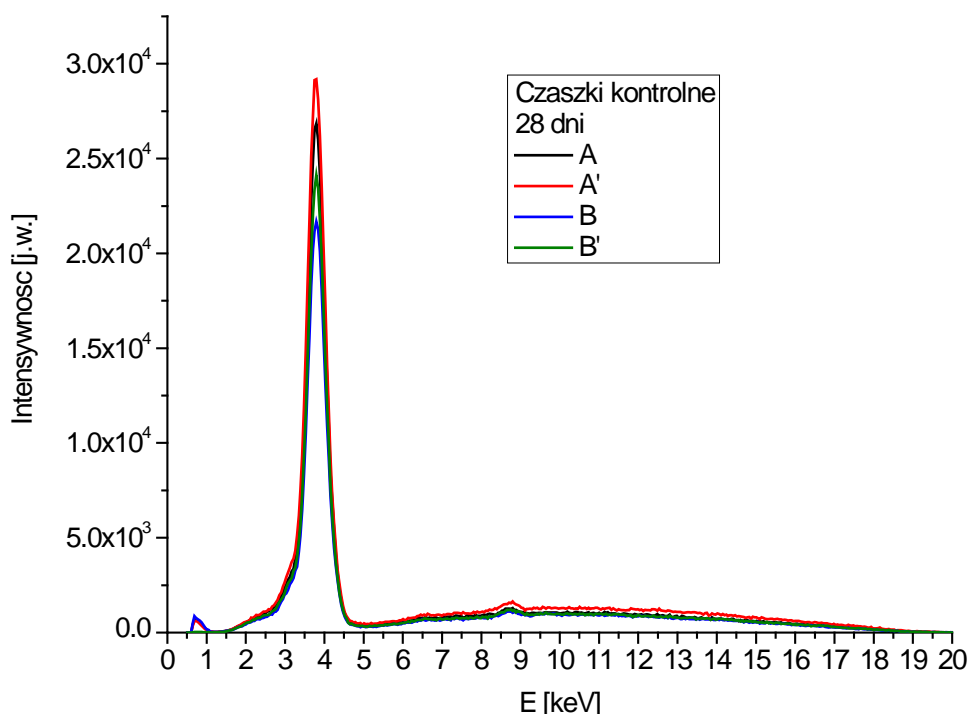
Grupa parametrów	Parametr	Wartość	Jednostka
Źródło promieniowania X – cd.	Kąt odbicia promieniowania pierwotnego	90°	
	Materiał okienka	Be	
	Grubość okienka	250	µm
Przetwarzanie widma – dekonwolucja gaussowska	Dekonwolucja nieliniowa	Tak	
	Maksymalna liczba iteracji	5	
	Maksymalna zmiana linii względem linii rodzicielskiej	2	
	Maksymalna zmiana wzmocnienia spektrometru	100	eV
	Maksymalna zmiana szerokości pików w FWHM	15	%
Przetwarzanie widma – wygładzanie	Typ filtru	Gaussowski	
	Liczba punktów filtru	3	
Przetwarzanie widma – usuwanie tła	Filtr górnoprzepustowy	530	eV
	Maksymalna liczba iteracji	40	
Przetwarzanie widma – usuwanie pików sumowania	Rozdzielczość czasowa wzmacniacza	7.2	µs
	Stała czasowa wzmacniacza	38.4	µs

Tab. 4. Parametry analizy FP

Po ustaleniu optymalnych parametrów wykonywania analizy FP oraz sprawdzeniu ich na etapie walidacji, przystąpiono do analizy widm kości szczurów.

Widma XRF w funkcji obszaru kości

Na rys. 12 znajdują się przykładowe widma fluorescencji X zebrane z powierzchni czaszek szczurów kontrolnych z obszarów z kości czołowej (obszary A i A') oraz z kości ciemieniowej (obszary B i B'). Widoczny jest wyraźny, wysoki pik pochodzący od Ca w okolicach energii 3.7 keV, niesymetryczny w części niskich energii. W rejonie 8.7 keV można zaobserwować wzniesienie powyżej tła promieniowania hamowania pochodzące od Zn. Widać, iż intensywność fluorescencji jest wyższa dla obszarów z kości z tyłu głowy niż z przodu.

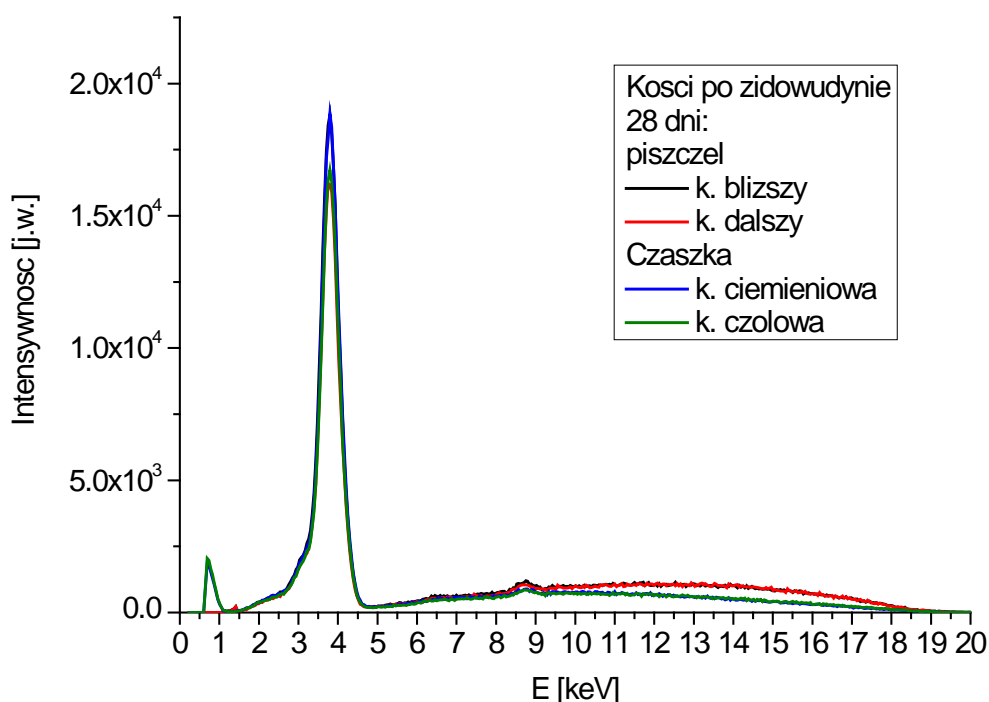


Rys. 12. Przykładowe widma fluorescencji X pochodzące z kości ciemieniowej (obszar A i A') oraz czołowej (obszar B i B') czaszki 28-dniowego szczura kontrolnego

Widma XRF w zależności od typu kości

Przykładowe widma różnych typów kości na przykładzie kości szczurów, których matkom podawano *zidowudynę*, zebrane są na rys. 13. Przedstawione są na nim widma fluorescencji X kości piszczelowych oraz

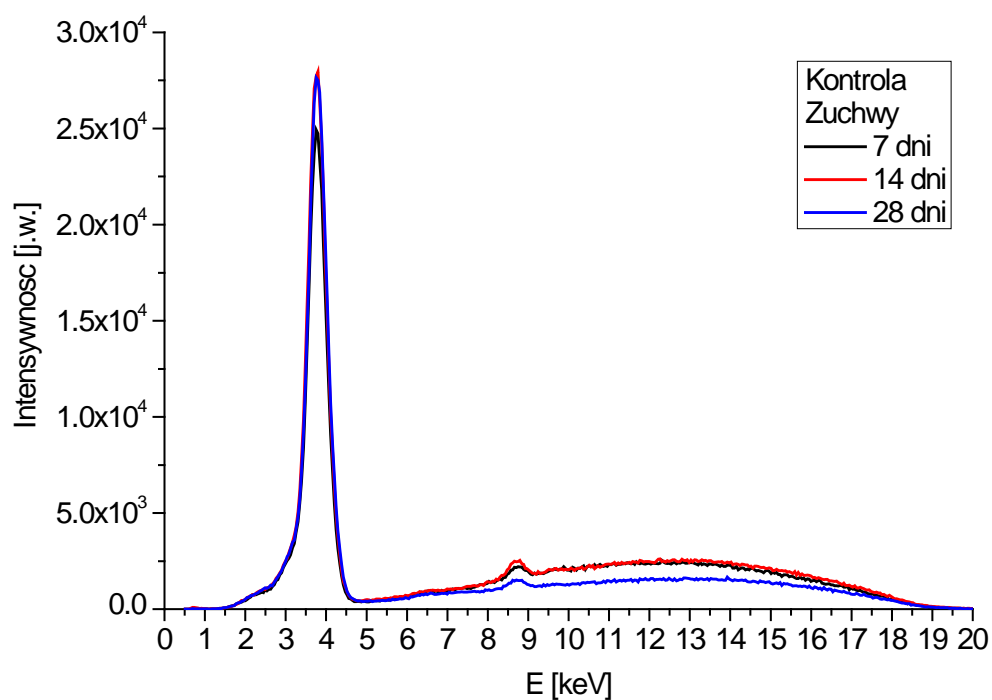
czaszek szczurów 28-dniowych. Można zauważyć, iż widmo ciągle jest mniejsze w przypadku kości czaszek, które są bardziej zbite niż piszczele.



Rys. 13. Przykładowe widma fluorescencji X pochodzące z okolic końca bliższego i dalszego kości piszczelowych oraz kości ciemieniowej i czołowej czaszki 28-dniowego szczura, którego matce podawano zidowudynę

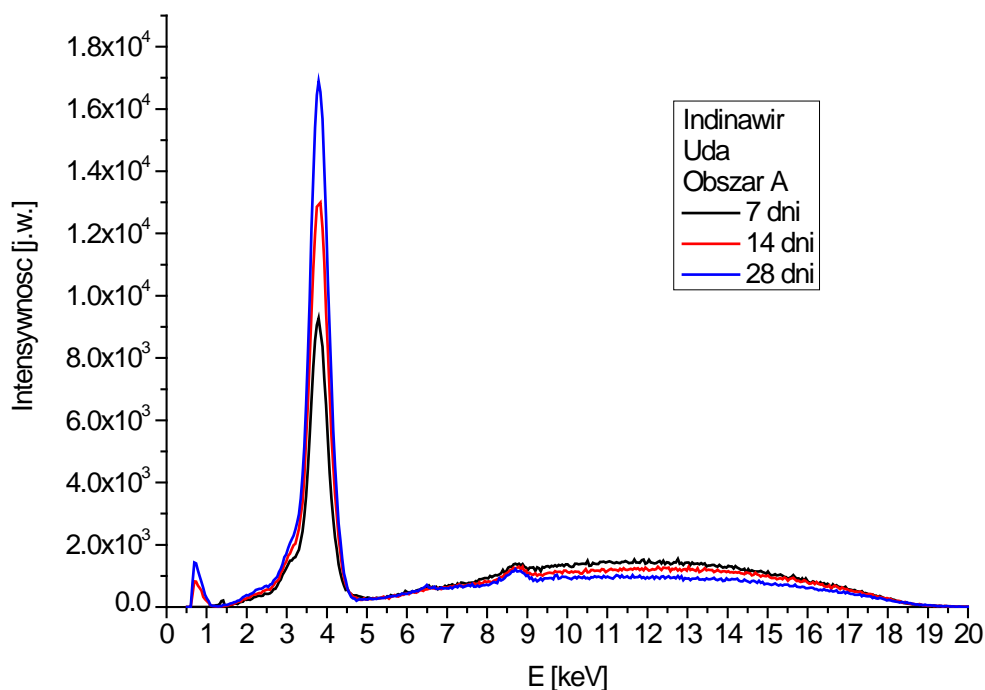
Widma XRF w funkcji wieku szczurów

Na rys. 14 przedstawione są reprezentatywne widma fluorescencji X żuchwy 7-, 14- i 28-dniowych szczurów kontrolnych. Widać, iż widma dla wszystkich grup wiekowych różnią się wysokością pików – pik pochodzący od Ca jest najniższy u najmłodszego szczura, pik Zn natomiast najniższy jest dla najstarszego szczura oraz wysokością widma hamowania – w tym przypadku najmniejsze jest ono dla próbki kości pochodzącej od najstarszego szczura, co jest związane ze wzmacnianiem i zagęszczaniem konstrukcji kości, a przez to ze zmniejszaniem efektów rozproszeniowych z wiekiem osobników.



Rys. 14. Reprezentatywne surowe widma fluorescencji X żuchw kontrolnych szczurów 7-, 14- i 28-dniowych

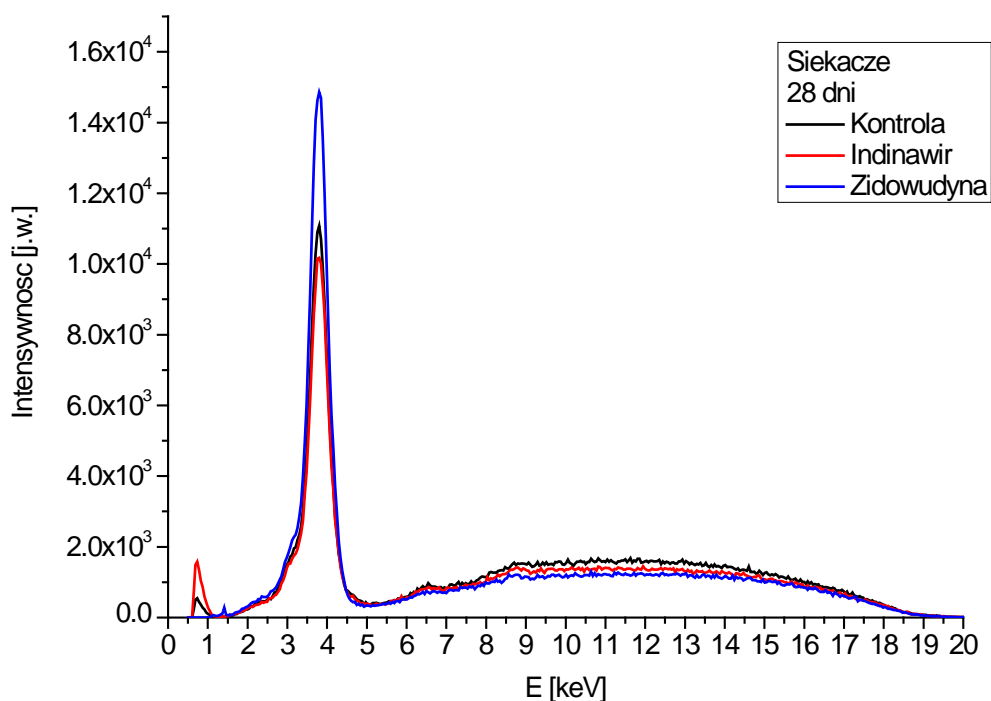
Reprezentatywne widma kości udowych 7-, 14- i 28-dniowych szczurów, których matkom podawano *indinawir* są przedstawione na rys. 15. Widać, iż kształt widm jest podobny do widm kości kontrolnych. Podobna jest również tendencja wzrostu intensywności pików pochodzącego od Ca z wiekiem szczurów.



Rys. 15. Przykładowe widma fluorescencji X pochodzące z okoli końca bliższego kości udowych 7-, 14- i 28-dniowych szczurów, których matkom podawano indinawir

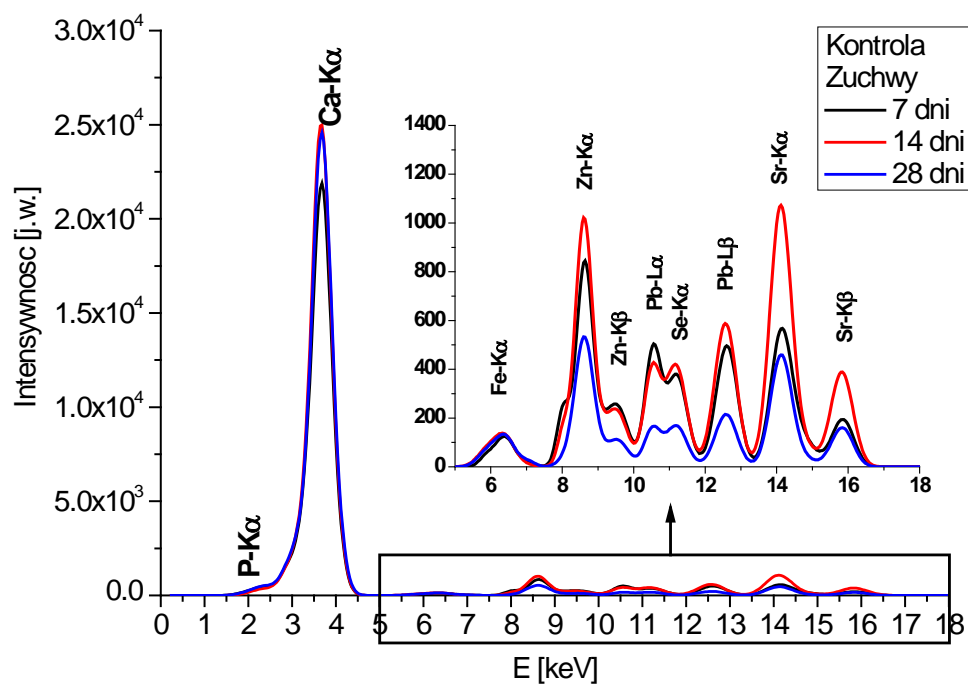
Wpływ stosowania leków indinawir i zidowudyna na widma XRF

Na rys. 16 zebrano widma pochodzące od siekaczy 28-dniowych szczurów należących do grup lekowych (*indinawir* i *zidowudyna*) w porównaniu z kontrolą. Widma mają podobny kształt, intensywność pików pochodzącego od Ca jest porównywalna z kontrolą u szczura, którego matce podawano w ciąży *indinawir*, a wyższa u szczura, którego matce podawano *zidowudynę*.



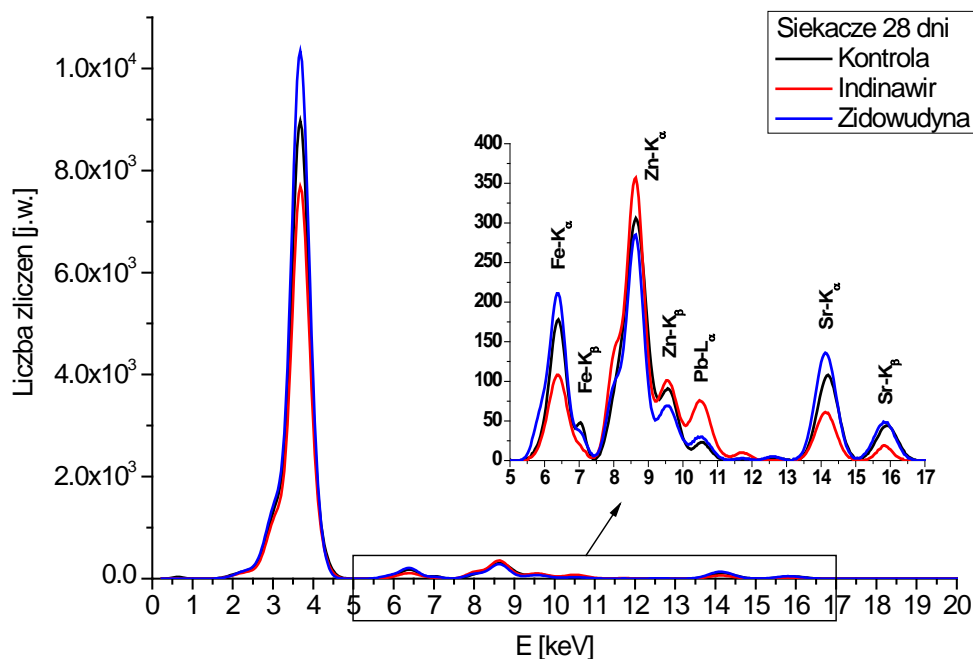
Rys. 16. Przykładowe widma fluorescencji X pochodzące z siekaczy 28-dniowych szczurów: kontrolnego, po matczynej aplikacji indinawirem i zidowudyną

Widma te nie dają informacji na temat zawartości ilościowej poszczególnych pierwiastków, dlatego każde widmo przetworzono wskutek analizy ilościowej z wykorzystaniem metody parametrów fundamentalnych, omówionej w poprzednim podrozdziale pracy. Przetworzone widma żuchw szczurów kontrolnych przedstawione są na rys. 17.



Rys. 17. Reprezentatywne widma po przetworzeniu żuchw szczurów kontrolnych 7-, 14- i 28-dniowych

Rys. 18 ilustruje analogiczne przetworzone widma siekaczy 28-dniowych szczurów kontrolnych oraz szczurów, których matkom podawano *indinawir* i *zidowudynę*.



Rys. 18. Reprezentatywne widma XRF po przetworzeniu zebrane z siekaczy szczurów 28-dniowych

Na widmach po analizie FP można wyróżnić linię Ca-K α o energii promieniowania charakterystycznego 3.69 keV wraz z lekkim wybrzuszeniem niskoenergetycznej krawędzi w rejonie 2-2.5 keV pochodzącej prawdopodobnie od P lub S, a także linie promieniowania charakterystycznego: Fe-K α , Zn-K α i Zn-K β , Pb-L α i Pb-L β , Se-K α , Sr-K α i Sr-K β o energiach odpowiednio: 6.4, 8.64 i 9.57, 10.55 i 12.61, 11.22, 14.17 i 15.84 keV. Dzięki wyliczonym współczynnikom kalibracyjnym uzyskano stężenia poszczególnych pierwiastków. W tab. 6 przedstawiono przykładowe wyniki składu pierwiastkowego trzonu żuchwy 28-dniowego szczura kontrolnego.

Pierwiastek	Linia	Intensywność	Błąd intensywność	Dolna granica ROI	Górna granica ROI	Koncentracja	Błąd koncentracji
Si	Ka	0	0	0	0	.02	0
P	Ka	1.083	.155	1.718	2.307	.880	.126
K	Ka	0	0	3.014	3.609	0	0
Ca	Ka	1144.7	5.043	3.391	3.988	33.057	.145
Mn	Ka	1.706	.194	5.587	6.198	2.5E-04	2.8E-05
Fe	Ka	14.874	.574	6.090	6.704	3.0E-02	1.1E-03
Cu	Ka	.392	9.3E-02	7.724	8.350	7.9E-05	1.9E-05
Zn	Ka	31.066	.830	8.311	8.942	.130	3.4E-03
As	Ka	.852	.137	10.201	10.850	5.0E-04	8.1E-05
Se	Ka	.319	8.4E-02	10.873	11.530	2.4E-04	6.4E-05
Sr	Ka	3.650	.284	13.786	14.476	.119	9.2E-03
Cd	La	5.852	.360	2.831	3.429	4.754	.292
Pb	La	.240	7.3E-02	10.142	10.858	4.6E-04	1.4E-04

Tab. 5. Wyznaczone stężenia pierwiastków w reprezentatywnej żuchwie kontrolnego szczura 28-dniowego

Pierwiastki lekkie o energiach poniżej 2 keV (do Al) są niewykrywalne w analizie XRF w zastosowanym układzie, założono więc ich stałą ilość zgodną z wartościami certyfikowanymi przez NIST, wedle zaleceń producenta programu do analizy FP. W wyniku przekształceń intensywności pików pochodzących od poszczególnych linii promieniowania

charakterystycznego danych pierwiastków zawartych w próbce, uwzględniających zakres energetyczny występowania tych pików, wyliczono stężenia następujących pierwiastków: Si, P, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, As, Se, Sr, Cd i Pb. Ważnym podkreślenia jest fakt, iż pierwiastki takie jak: Si oraz P mają energię, dla której stosowany w eksperymencie detektor ma słabą wydajność (poniżej 30%). Z tego powodu, mimo iż P jest jednym z makroelementów występującym w dużych ilościach w kościach, nie zostały one uwzględnione w analizie statystycznej. Pierwiastki: Mn, Cu, As, Se, Cd i Pb w próbce referencyjnej Bone Meal występowały w ilościach śladowych, natomiast w próbkach walidacyjnych nie występowały w ogóle. W związku z tym ich stężeń również nie poddano analizie statystycznej. K jest niewykrywalny w próbkach kości, ponieważ pik promieniowania charakterystycznego pochodzącego od K znajduje się w bliskim sąsiedztwie Ca.

Do analizy statystycznej wybrano pierwiastek główny Ca oraz pierwiastki śladowe: Fe, Zn i Sr ze względu na sprawdzoną poprawność działania analizy FP dla tych pierwiastków, ale również ze względu na powszechnie znaną (Ca) i interesującą (Fe, Zn, Sr) rolę tych elementów w procesie rozwoju i budowy kości. Podobne analizy przeprowadzono dla wszystkich wyników, co zostało wykazane w analizie statystycznej przedstawionej w dalszej części rozprawy.

Z uwagi na fakt, iż prowadzone pomiary były wykonywane na próbkach całych kości, wybrano kilka reprezentatywnych próbek, które zmielono przy użyciu młynka mechanicznego z kulami cyrkonowymi, a następnie wykonano z nich tabletki, by sprawdzić, czy zawartość pierwiastków w próbkach zhomogenizowanych będzie porównywalna do wyników uzyskanych w pracy. Tab. 9 przedstawia stężenia badanych pierwiastków w piszczelach całych oraz zmielonych.

	Kości całe		Kości zmielone - tabletki	
	stężenie [wt%]	SD	stężenie [wt%]	SD
Ca	33.17	3.43	30.17	1.11
Fe	0.031	0.010	0.054	0.020
Zn	0.191	0.078	0.130	0.011
Sr	0.203	0.183	0.585	0.304

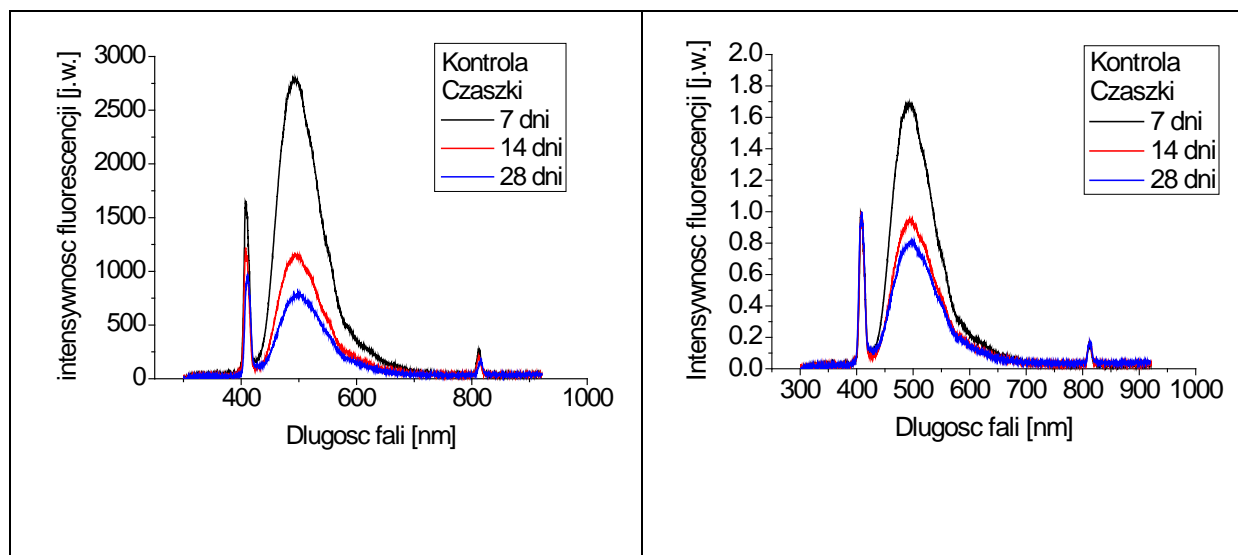
Tab. 6. Stężenia Ca, Fe, Zn i Sr w wybranych całych oraz zmielonych kościach piszczelowych 28-dniowych szczurów kontrolnych

Jak widać w tab. 9, wyznaczone stężenia próbek zmielonych i tabletkowanych, pokrywają się z wynikami próbek w całości. Potwierdza to fakt, iż pierwiastki kumulują się w zewnętrznych warstwach kości, co zostało zasygnalizowane w [Zn8]. Jednocześnie wykonana analiza daje wiarygodne rezultaty badania zawartości składników mineralnych w kościach.

Wyniki badań uzyskane metodą fluorescencji LIF

Widma LIF w zależności od wieku szczura

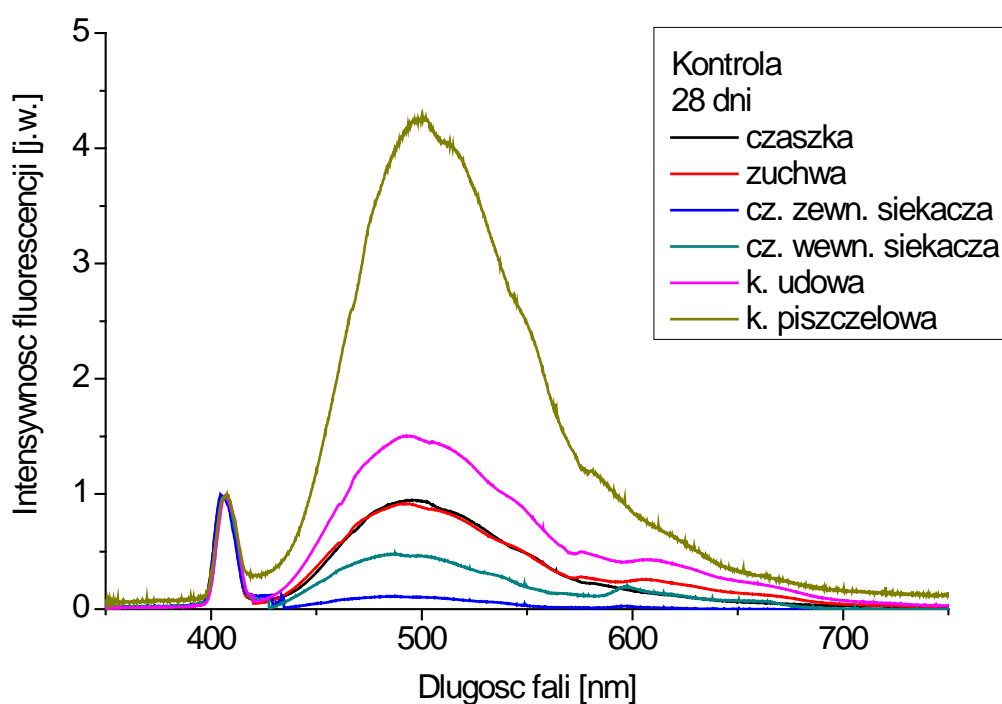
Uzyskane widma fluorescencji pod wpływem wzbudzenia laserem 407 nm mieszczą się w zakresie 407-814 nm (Rys. 20). Widma te należy znormalizować do piksu wzbudzającego 407 nm, aby móc je poprawnie analizować. Na rys. 19a przedstawione są przykładowe widma LIF kości pokrywki czaszki szczurów kontrolnych: 7-, 14- i 28-dniowych przed normalizacją, a po normalizacji na rys. 19b.



Rys. 19. Reprezentatywne surowe widma fluorescencji LIF czaszek szczurów kontrolnych 7-, 14- i 28-dniowych przed (a) i po (b) normalizacji

Widma LIF w zależności od typu kości

Rys. 20 przedstawia widma fluorescencji LIF różnych typów kości szczurów kontrolnych w wieku 28 dni.

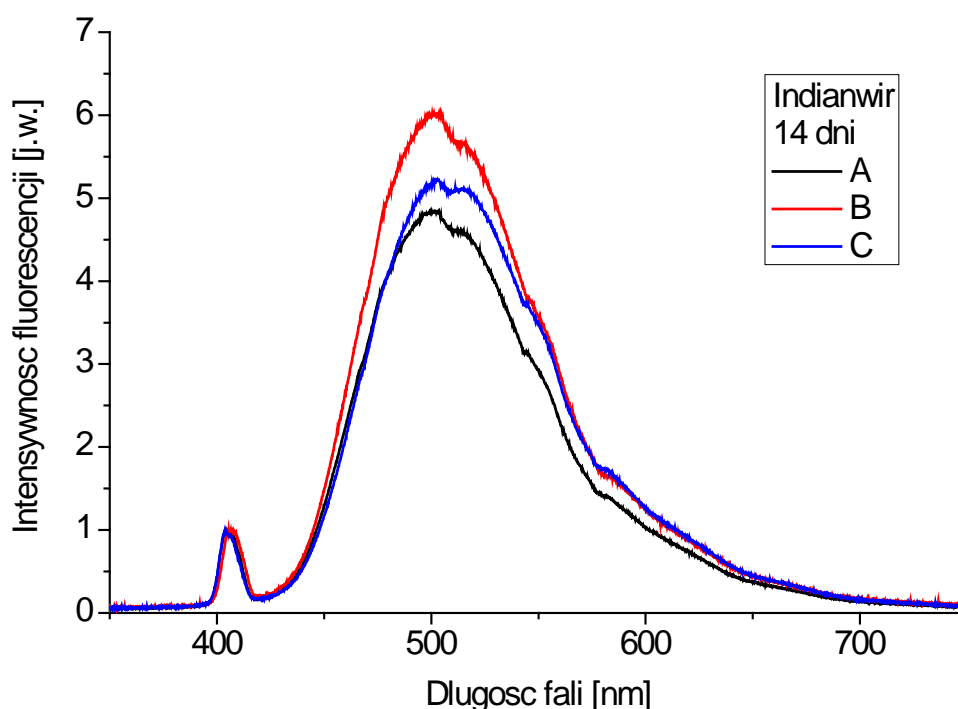


Rys. 20. Przykładowe widma LIF 28-dniowych szczurów kontrolnych z różnych kości

Widoczna jest różnica w intensywności fluorescencji LIF między różnymi typami kości. Najniższą intensywność uzyskano dla siekaczy, a najwyższą dla kości długich.

Widma LIF w zależności od obszaru na kości

Rys. 21 prezentuje przykładowe widma LIF piszczeli zebrane z różnych obszarów: okolicy końca bliższego (obszar A), trzonu (obszar B) i okolicy końca dalszego (obszar C) szczura 14-dniowego, którego matce podawano w czasie ciąży *indinawir*. Na wykresie widać, iż widma z różnych obszarów mają porównywalną intensywność.

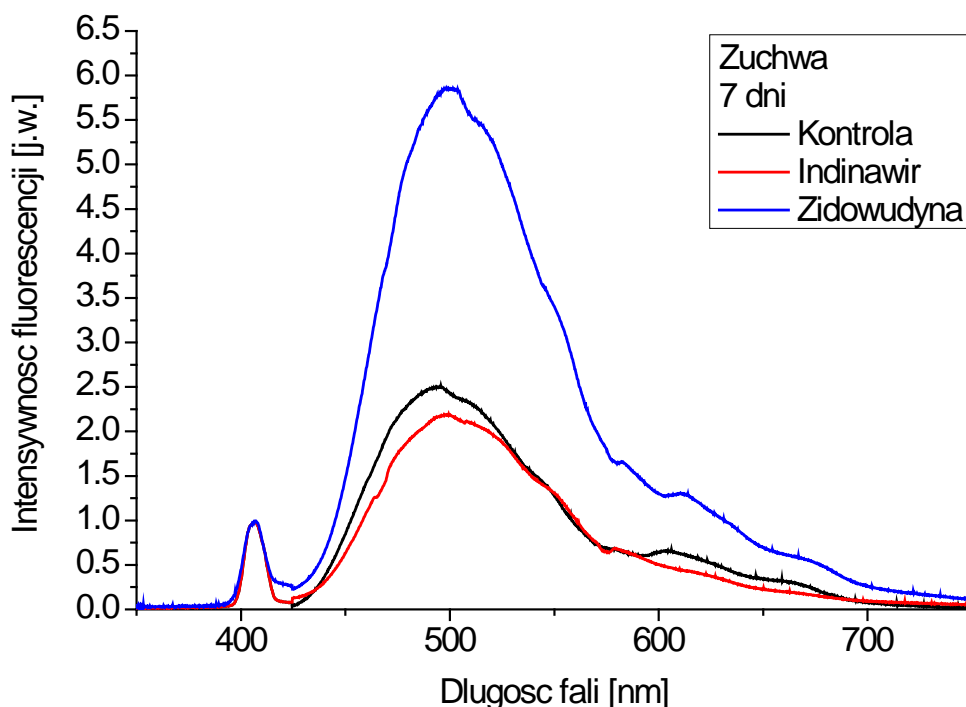


Rys. 21. Przykładowe widma LIF 14-dniowych szczurów, których matkom podawano indinawir z różnych obszarów kości piszczelowej

Wpływ leków indinawir i zidowudyna na fluorescencję LIF

Reprezentatywne widma LIF żuchw szczurów kontrolnych oraz szczurów, których matkom podawano *indinawir* i *zidowudynę* zestawione są na rys. 22. Widoczny jest dużo bardziej intensywny pik fluorescencji LIF w

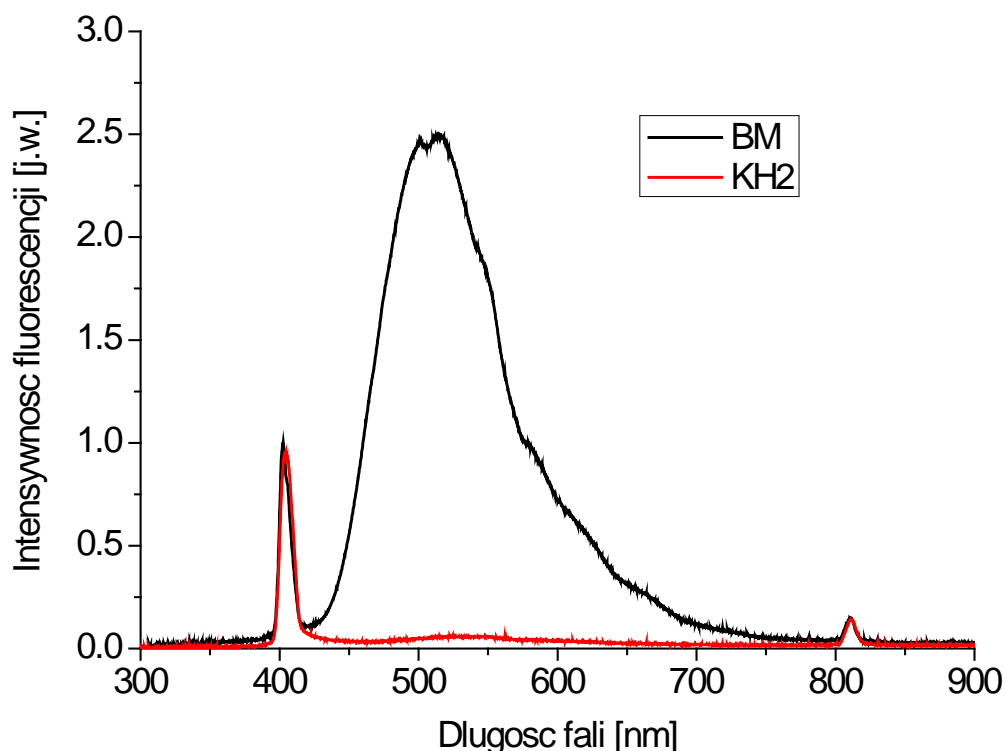
żuchwie szczura, którego matce podawano *zidowudynę* w porównaniu do pozostałych.



Rys. 22. Przykładowe widma LIF 7-dniowych szczurów z grup lekowych i kontroli

Na każdym z powyższych widm widoczny jest szeroki pik przypadający na zakres 430-700 nm z prawoskośną asymetrią. Maksimum piku przypada na wartość ok. 500 nm.

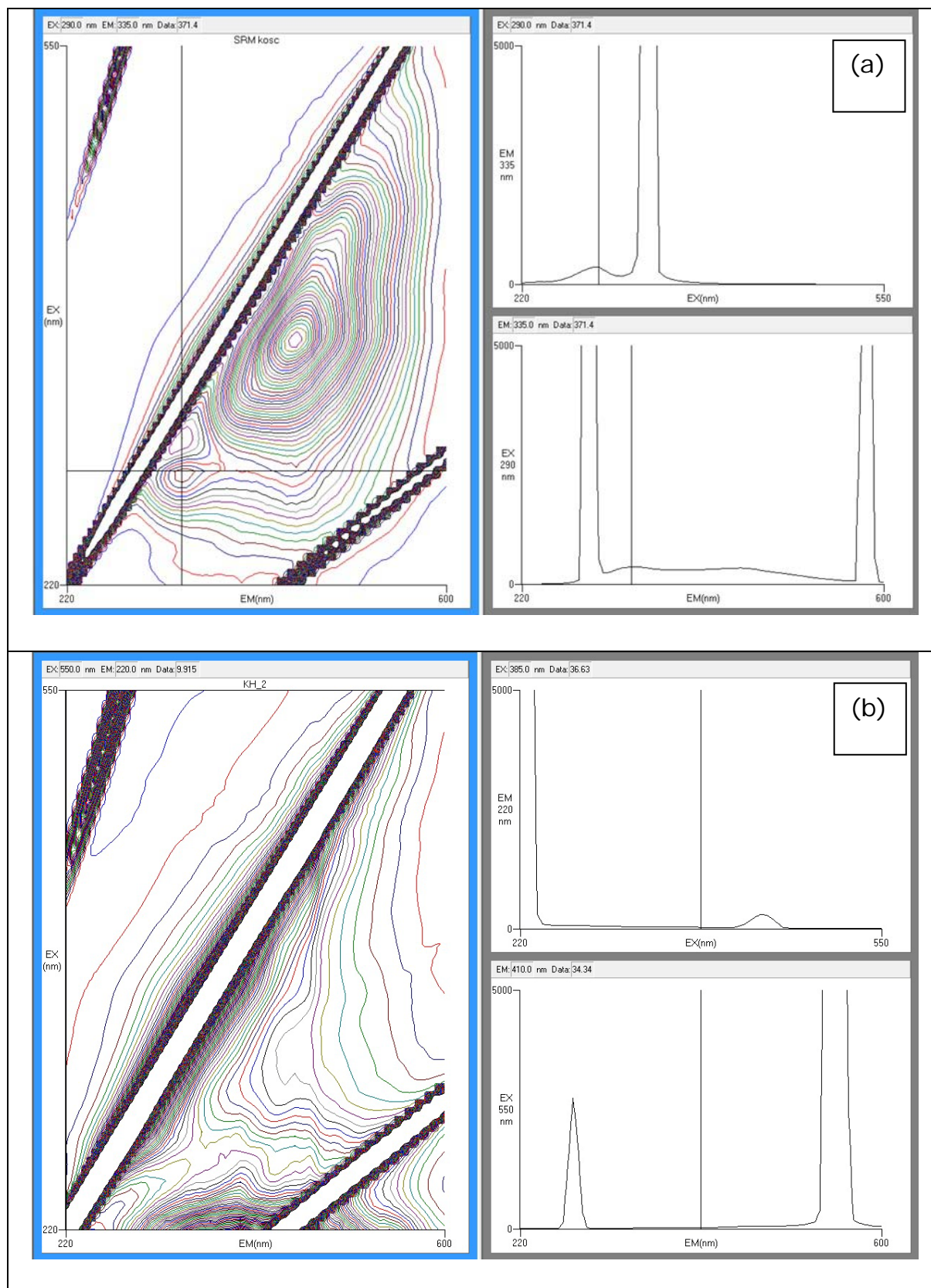
Rys. 23 przedstawia widma fluorescencji LIF próbki kości referencyjnej SRM BM oraz próbki wapienia KH-2, który ma strukturę nieorganiczną podobną do hydroksyapatytu, ale nie zawiera substancji organicznych.



Rys. 23. Widma LIF próbek referencyjnych: kości (BM) oraz wapienia (KH-2)

Na rys. 23 widmo fluorescencji kości BM jest podobne w kształcie i intensywności do widm badanych kości, natomiast widmo pochodzące od wapienia KH-2 jest niemal niewidoczne. Widma te wykazują, że fluorescencja LIF pochodzi od części organicznych, pobudzonych przez działanie promieniowania o długości 407 nm.

Wyniki z rys. 23 postanowiono porównać z mapami fluorescencji wykonanymi w ramach pracy magisterskiej p. Izabeli Schisler [78] przy użyciu spektrofotometru Hitachi w zakresie 220-600 nm, zaprezentowanymi na Rys. 24.



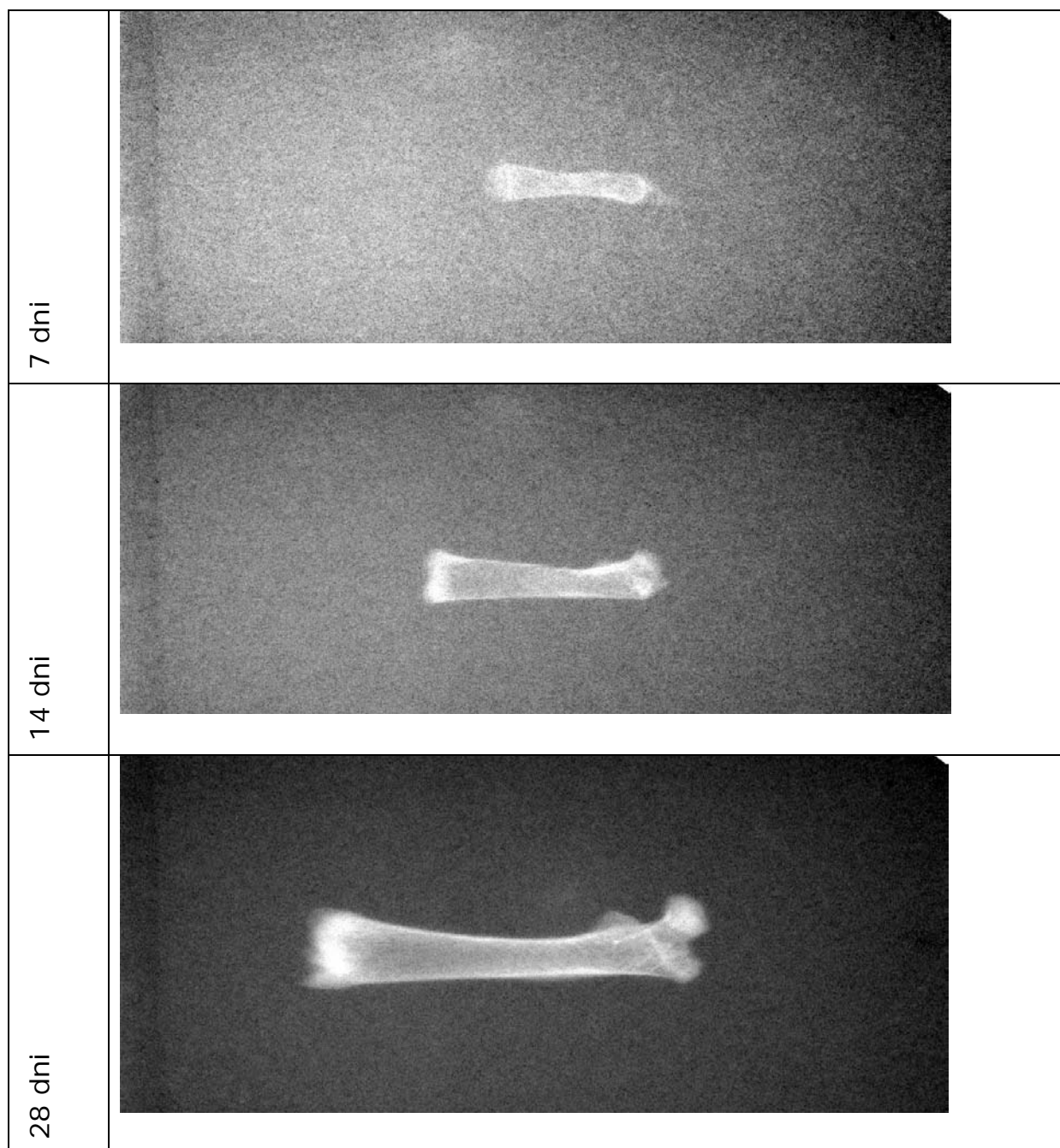
Rys. 24. Mapy fluorescencji w zakresie 220-550 nm kości referencyjnej SRM BM (a) oraz wapienia KH-2 (b)

Na mapie fluorescencji kości referencyjnej SRM BM widać dwa piki w zakresie: 290 nm dla wzbudzenia i 335 nm dla emisji oraz 370 nm wzbudzenia i 450 nm emisji. Jednocześnie widać, że sygnał ekscytacji obejmuje zakres aż do 550 nm, co oznacza, że wzbudzając tę próbkę laserem o długości fali 407 nm również możemy pobudzić składniki, które dają widoczny na mapie sygnał. Na mapie pochodzącej od wapienia KH-2, który nie zawiera składników organicznych, nie widać wyraźnego sygnału pochodzącego od wzbudzenia w zakresie 220-550 nm. W związku z tym wydaje się słuszne przyjąć, że fluorescencja kości pochodzi od endogennych fluoroforów występujących w kościach, jakimi są: koenzymy FAD i FMN, których maksimum emisji przypada w zakresie 465-535 nm, lipidy emitujące w zakresie 450 – 660 nm oraz witaminy, głównie D, z maksimum fluorescencji około 480 nm, a także porfiryny dających odpowiedź w okolicy 630, 690 nm [66]. Wg literatury kolagen ma maksimum wzbudzenia w okolicy 340 nm, ale możliwy jest również wkład od kolagenu przy pobudzeniu 407 nm.

Analiza porównawcza uśrednionych widm fluorescencji LIF pomiędzy poszczególnymi grupami przedstawiona jest w dalszej części pracy.

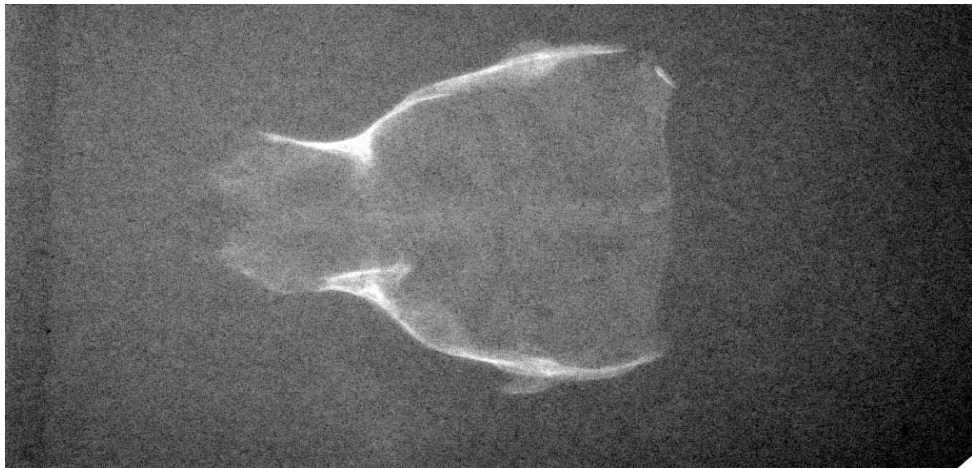
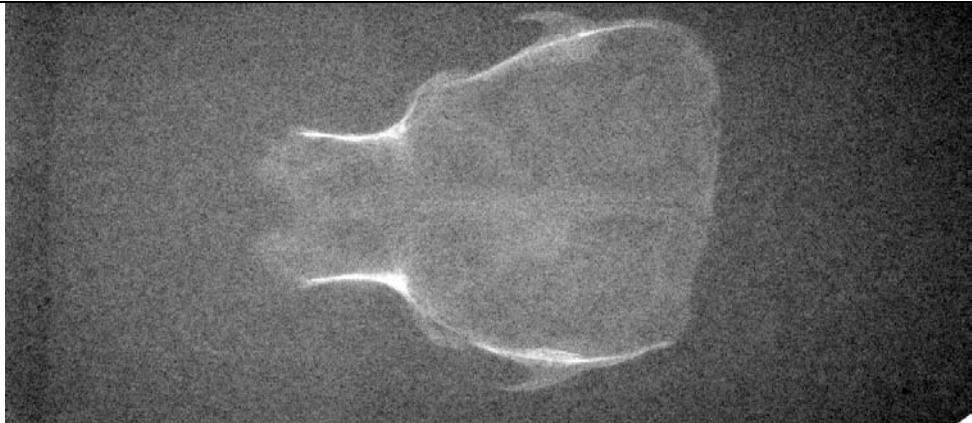
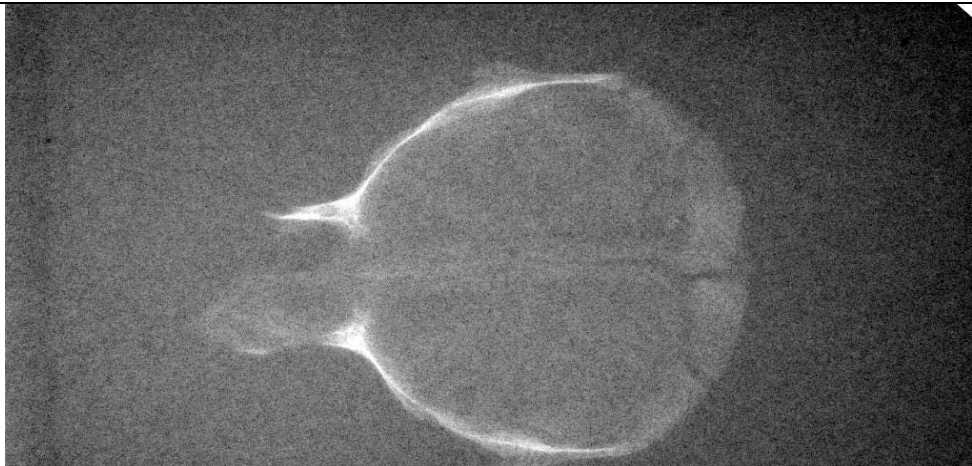
Wyniki pomiarów uzyskane metodą radiografii cyfrowej

Przykładowe, reprezentatywne zdjęcia radiograficzne kości udowych szczurów kontrolnych: 7-, 14- i 28-dniowego przedstawione są na rys. 25.



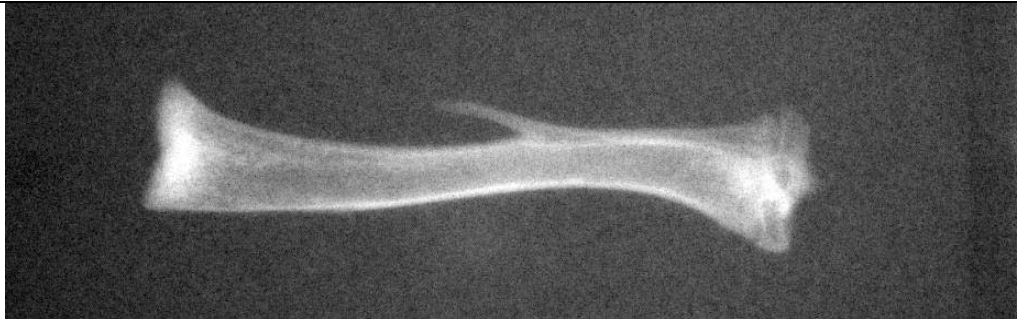
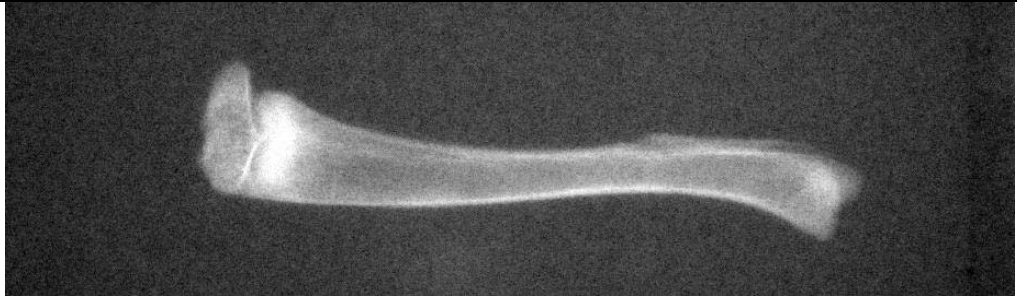
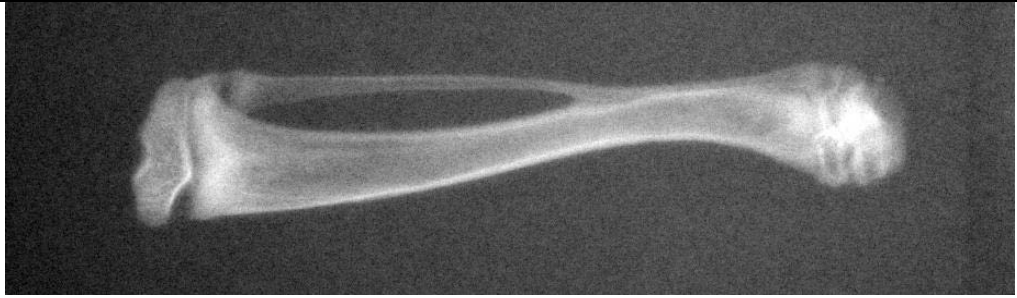
Rys. 25. Przykładowe zdjęcia radiografii cyfrowej kości udowych szczurów kontrolnych

Przykładowe zdjęcia czaszek 14-dniowych szczurów kontrolnych oraz szczurów, których matkom podawano *indinawir* i *zidowudynę*, przedstawia rys. 26.

Kontrola	
Indianwir	
Zidowudyna	

Rys. 26. Przykładowe zdjęcia radiografii cyfrowej czaszki 14-dniowych szczurów z grup lekowych oraz kontroli

Analogicznie, reprezentatywne zdjęcia kości piszczelowych, pochodzących od 28-dniowych szczurów, których matkom podawano placebo, *indinawir* i *zidowudynę* przedstawione są na rys. 27.

Kontrola		
Indinawir		
Zidowudyna		

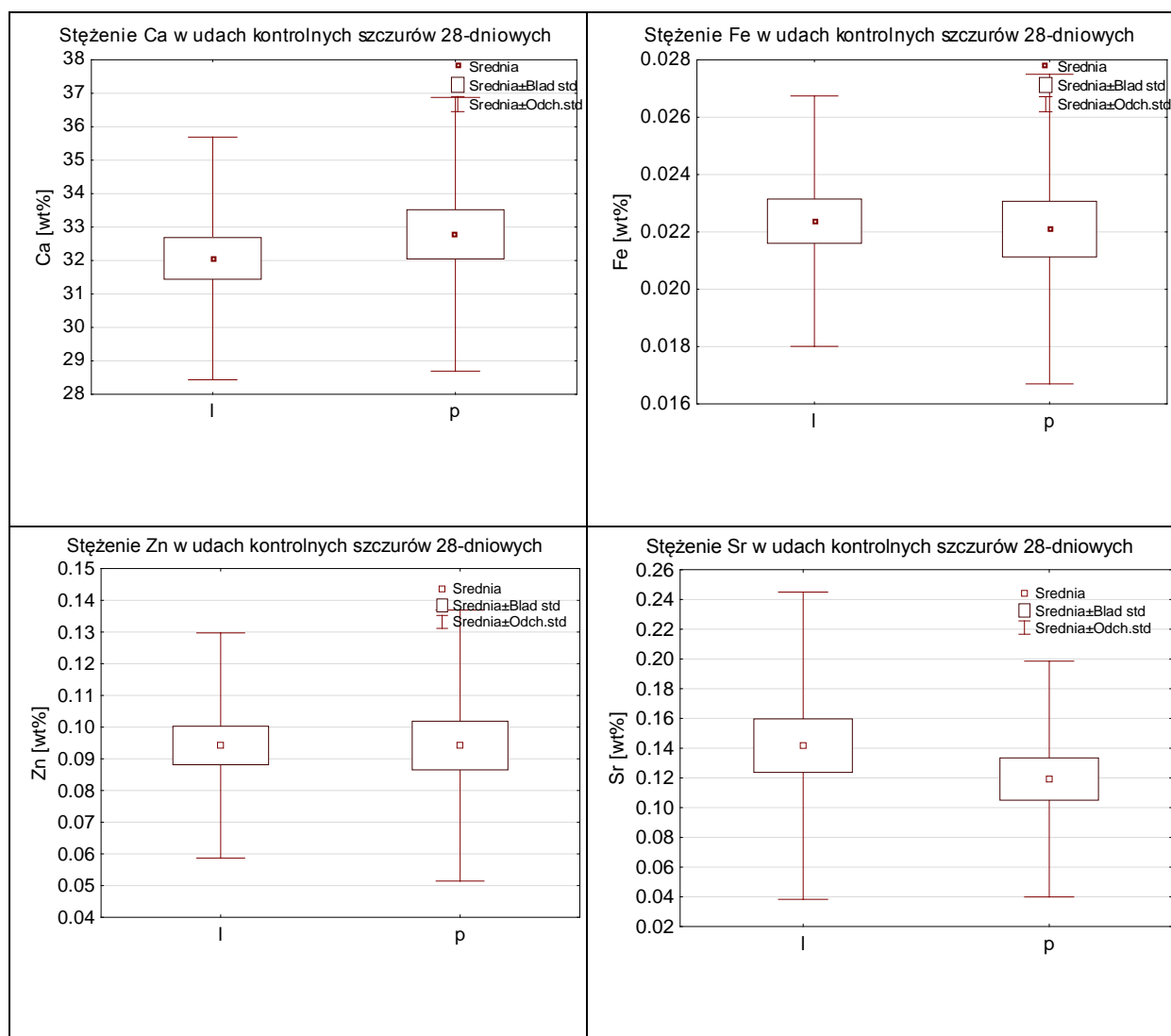
Rys. 27. Przykładowe zdjęcia radiografii cyfrowej kości piszczelowych 28-dniowych szczurów z grup lekowych oraz kontroli

Na podstawie zdjęć z rys. 25-27, trudno bezpośrednio wnioskować o różnicach między kośćmi z różnych grup. Z uwagi na decydującą rolę, jaką odgrywa w analizie zdjęć radiograficznych grubość próbki, która jest różna dla kości pochodzących od szczurów w różnym wieku, statystycznego porównania dokonano jedynie między kośćmi szczurów w tym samym wieku, ale w różnych grupach lekowych. W związku z tym wykonano analizę ilościową przedstawioną w dalszym rozdziale pracy.

Analiza statystyczna wyników pomiarów kości szczurów

Różnice między kośćmi symetrycznymi.

Analiza nie wykazała różnic w stężeniach analizowanych pierwiastków ani intensywności fluorescencji LIF między kośćmi symetrycznymi, zarówno dla kości długich, żuchw, zębów, jak i lewej oraz prawej strony czaszki (Rys. 28). W związku z tym wyniki badań dla kości z lewych i prawych stron ciała zostały uśrednione.

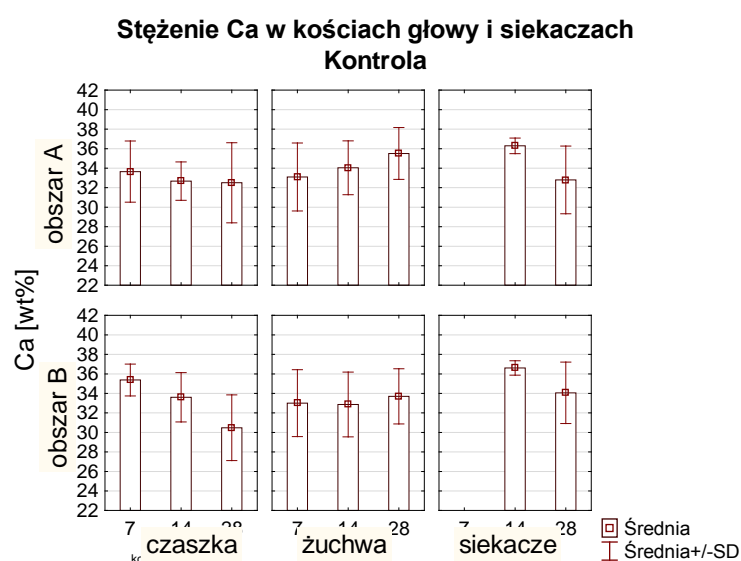


Rys. 28. Stężenia pierwiastków w lewych i prawych kościach udowych 28-dniowych szczurów kontrolnych

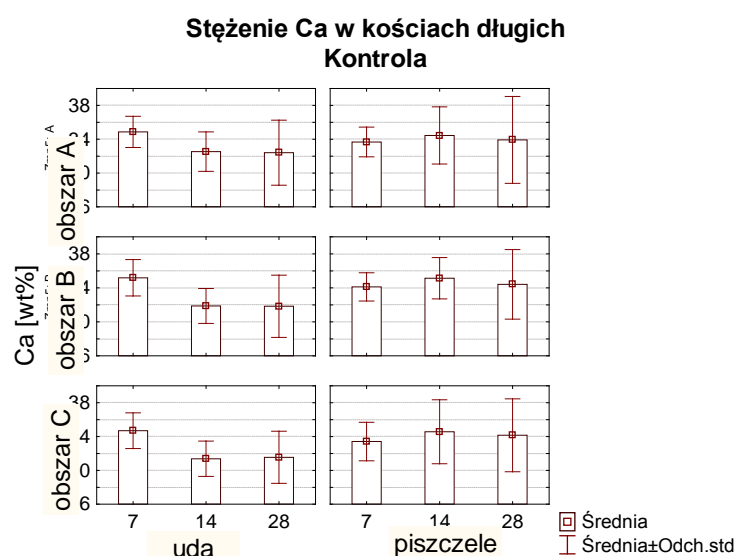
Zmiany z wiekiem szczurów

Wyniki badań metodą XRF

Zawartość Ca zmieniała się z wiekiem szczurów kontrolnych w różny sposób w różnych kościach. W czaszkach, siekaczach i udach lekko malała z wiekiem, w żuchwach lekko rosła, natomiast w piszczelach utrzymywała się na stałym poziomie, przy czym różnice istotne statystycznie z $p < 0.05$ obserwowano w siekaczach oraz między osobnikami 7-dniowych a pozostałymi w czaszkach (tylko w obszarze B) i udach (rys. 29 i 30).

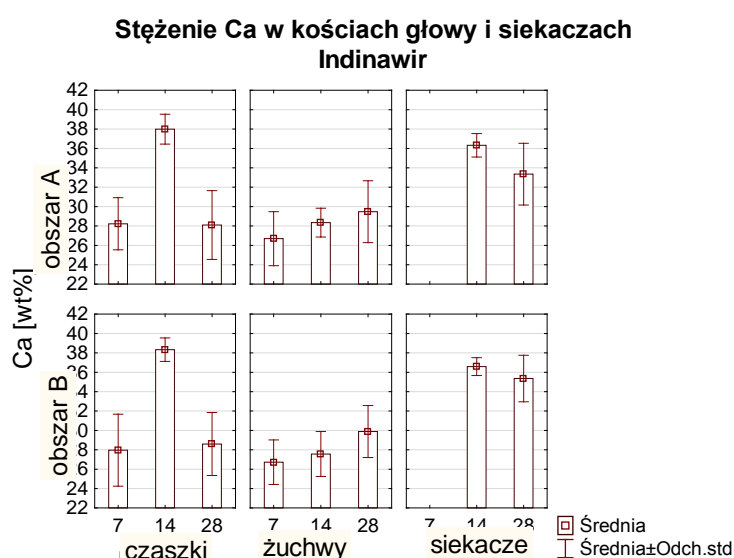


Rys. 29. Stężenie Ca w kościach głowy i siekaczach szczurów kontrolnych

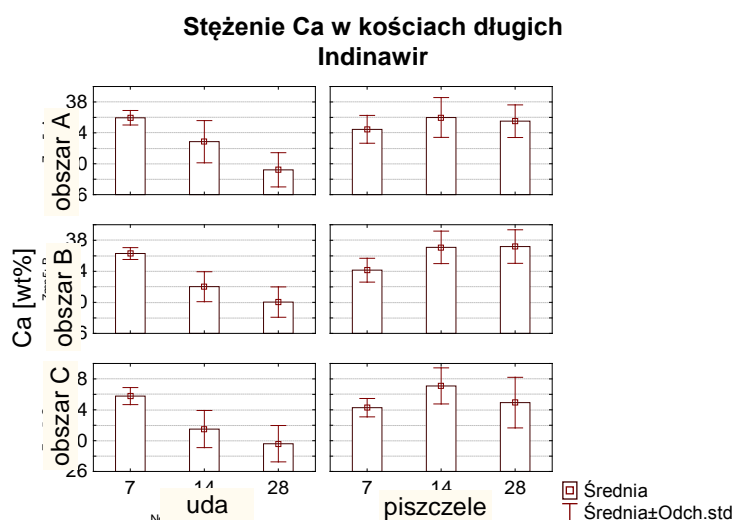


Rys. 30. Stężenia Ca w kościach długich szczurów kontrolnych

Zmiany z wiekiem szczurów po *indinawirze* miały taki sam charakter, jak w szczurach kontrolnych, z wyjątkiem czaszek i piszczeli szczurów 14-dniowych, w których zawartość Ca była największa (rys. 31 i 32). Różnice istotne statystycznie z $p < 0.05$ w tej grupie były między czaszkami szczurów 14-dniowych a pozostałymi, między żuchwami szczurów 7- i 28-dniowych, między udami szczurów 7-dniowych a pozostałymi oraz piszczelami szczurów 7- i 14-dniowych.

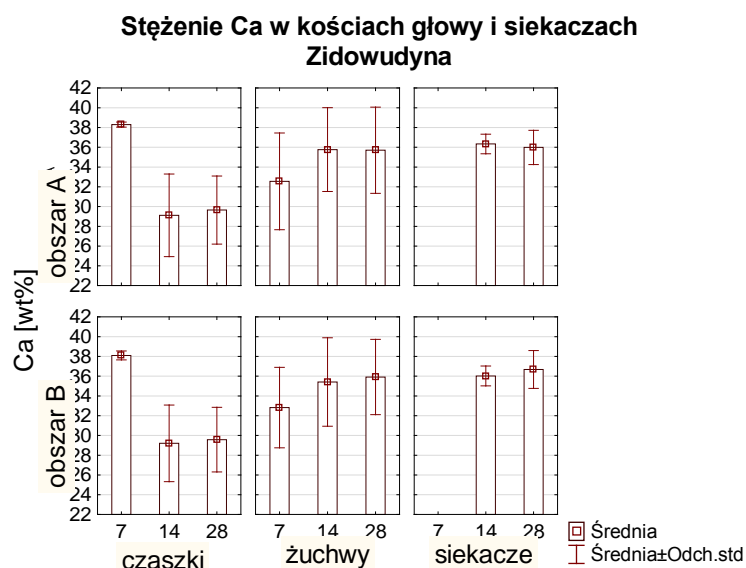


Rys. 31. Stężenie Ca w kościach głowy i siekaczach szczurów, których matkom podawano indinawir

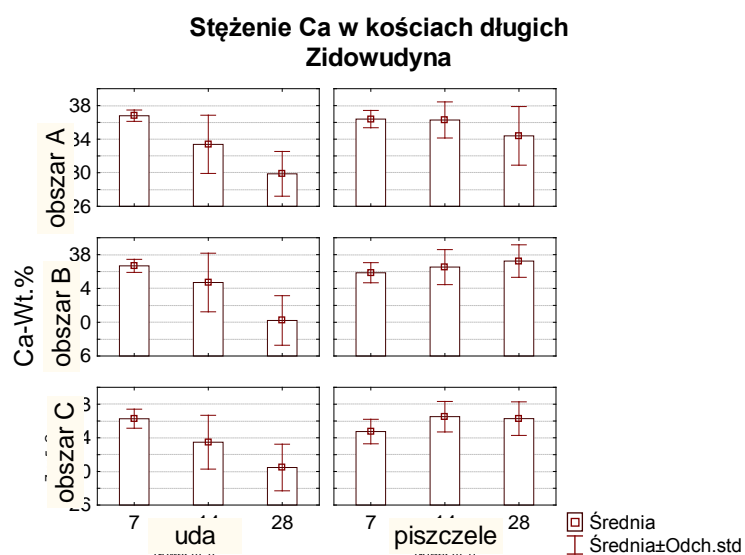


Rys. 32. Stężenie Ca w długich szczurów, których matkom podawano indinawir

Zmiany z wiekiem szczurów po podaniu matkom *zidowudyny* przebiegały podobnie jak w pozostałych grupach. Różnice istotne statystycznie z $p < 0.05$ widoczne były tylko między czaszkami i udami szczurów 7-dniowych a pozostałymi grupami wiekowymi (rys. 33 i 34).

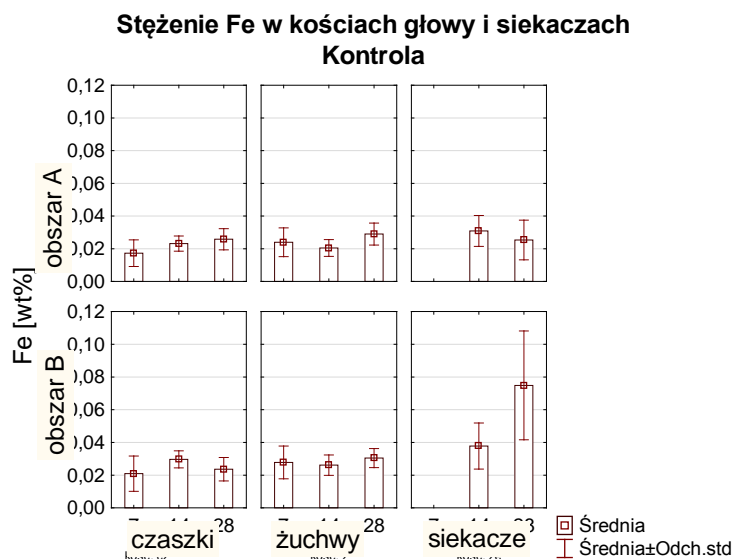


Rys. 33. Stężenie Ca w kościach głowy i siekaczach szczurów, których matkom podawano zidowudynę

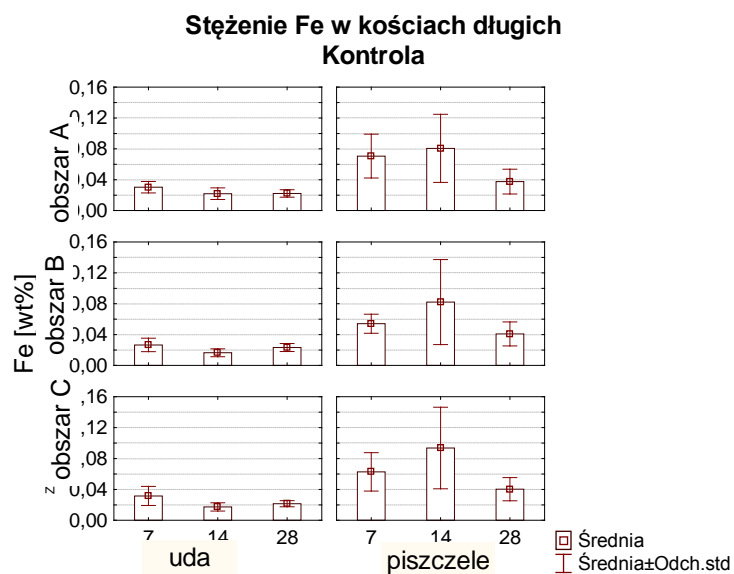


Rys. 34. Stężenie Ca w kościach długich szczurów, których matkom podawano zidowudynę

Poziom Fe nie zmieniał się istotnie z wiekiem szczurów kontrolnych w większości kości (rys. 35 i 36). Jedynie w części zewnętrznej siekaczy był większy u 28-dniowych niż u 14-dniowych szczurów, a w piszczelach odwrotnie ($p < 0.05$).

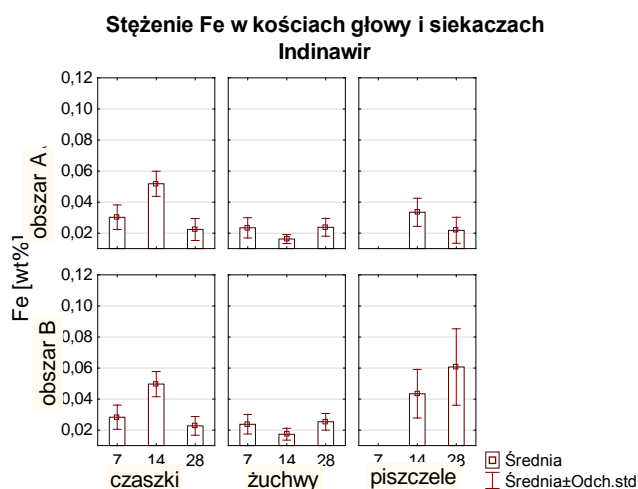


Rys. 35. Stężenie Fe w kościach głowy i siekaczach szczurów kontrolnych

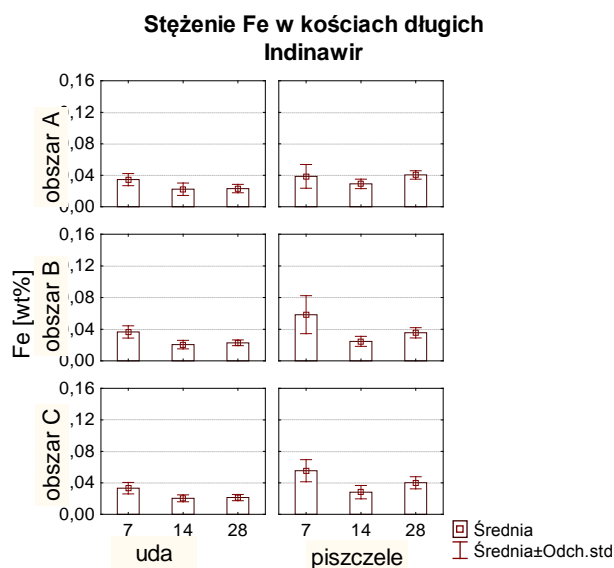


Rys. 36. Stężenie Fe w kościach długich szczurów kontrolnych

W żuchwach oraz kościach długich szczurów po podaniu *indinawiru* zawartość Fe nie zmieniała się istotnie z ich wiekiem, jedynie w obszarach B i C piszczeli zawartość Fe była istotnie większa u 7-dniowych niż u 14-dniowych szczurów. W części wewnętrznej siekaczy stężenie Fe było wyższe u 14-dniowych szczurów niż u 28-dniowych, w części zewnętrznej zmieniało się odwrotnie ($p < 0.05$). W czaszkach, podobnie jak stężenie Ca, największe, istotne statystycznie, było u 14-dniowych osobników (rys. 37 i 38).

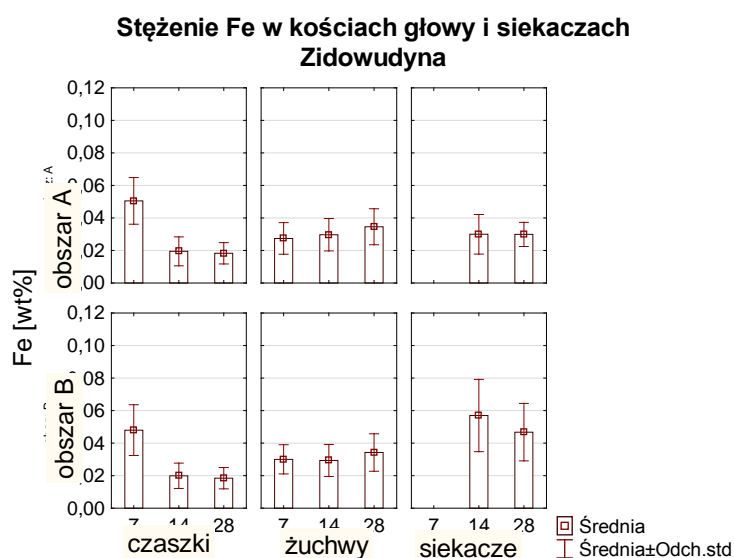


Rys. 37. Stężenie Fe w kościach głowy i siekaczach szczurów, których matkom podawano indinawir

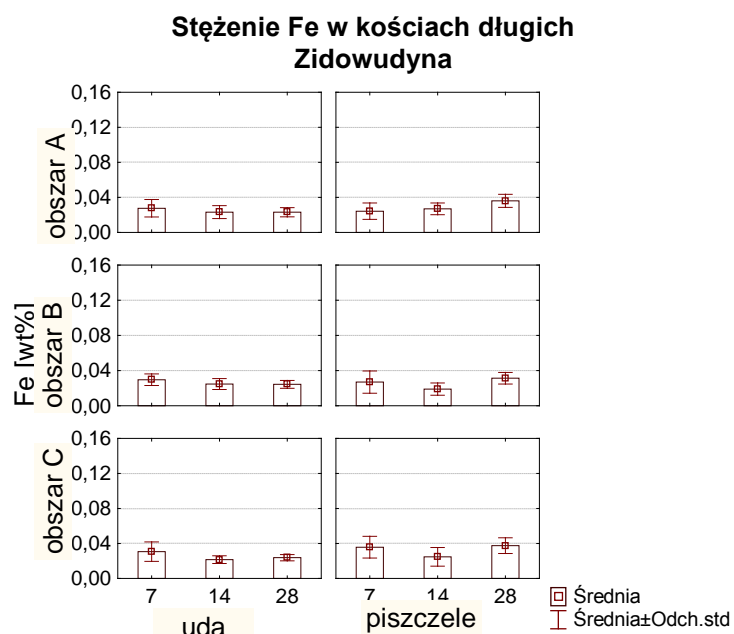


Rys. 38. Stężenie Fe w kościach długich szczurów, których matkom podawano indinawir

Zmiany Fe z wiekiem u szczurów, których matkom podawano *zidowudynę* występowały jedynie w czaszkach, gdzie można było zaobserwować spadek tej wielkości. Różnice istotne z $p < 0.05$ występowały między osobnikami 7-dniowymi a pozostałymi (rys. 39 i 40).

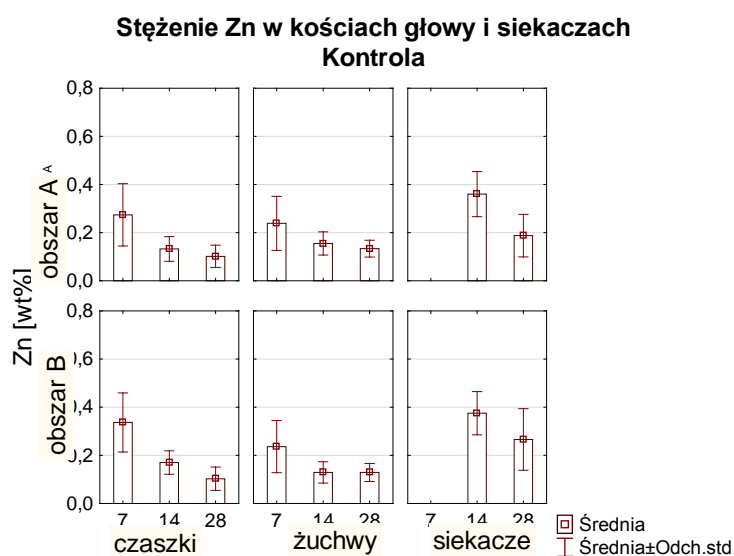


Rys. 39. Stężenie Fe w kościach głowy i siekaczach szczurów, których matkom podawano zidowudynę

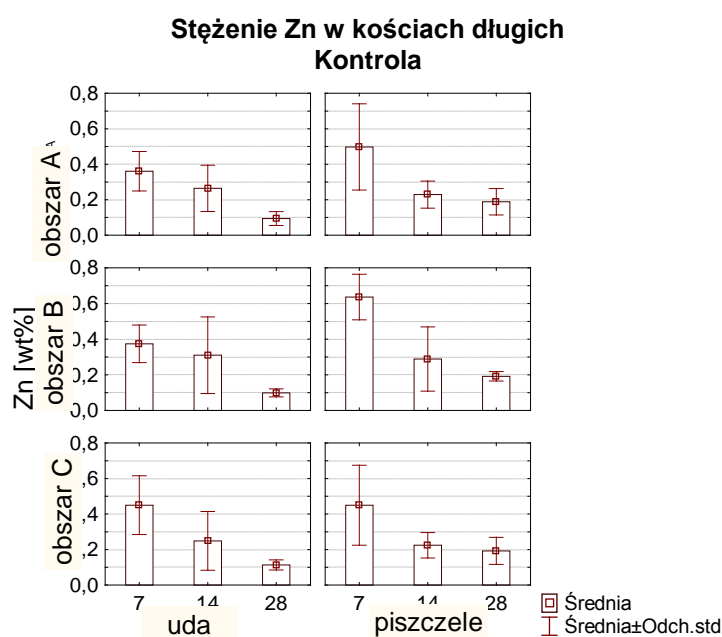


Rys. 40. Stężenie Fe w kościach długich szczurów, których matkom podawano zidowudynę

We wszystkich kościach szczurów kontrolnych następował istotny spadek zawartości Zn z wiekiem szczurów (rys. 41 i 42).

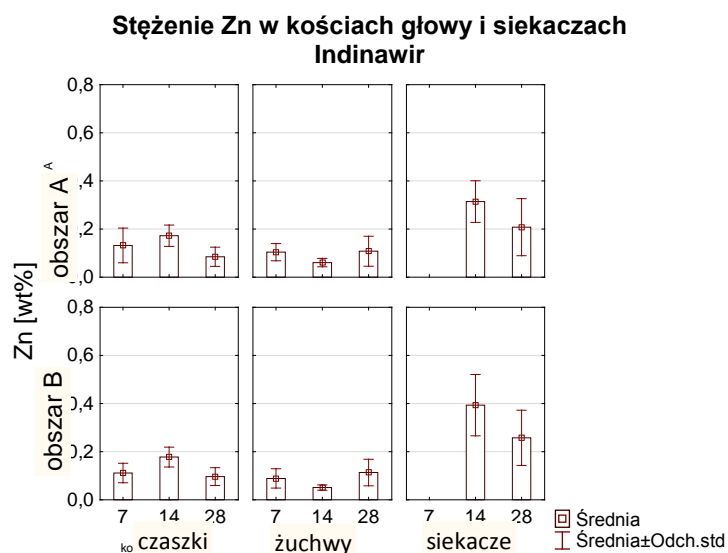


Rys. 41. Stężenie Zn w kościach głowy i siekaczach szczurów kontrolnych

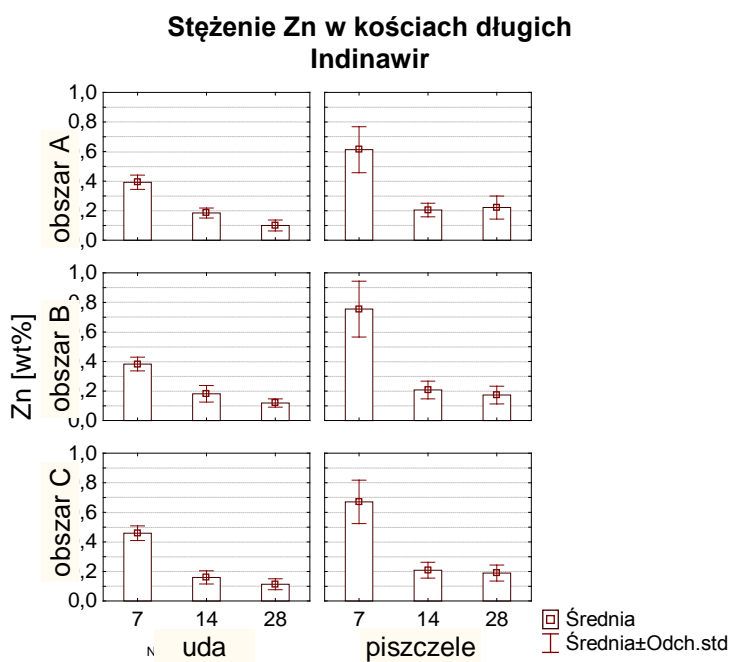


Rys. 42. Stężenia Zn w kościach długich szczurów kontrolnych

Podobne różnice widoczne były w grupie szczurów po podaniu *indinawiru*, przy czym w czaszkach występowało większe stężenie u 14-dniowych szczurów niż u innych grup, a różnice w żuchwach nie były istotne statystycznie (rys. 43 i 44).

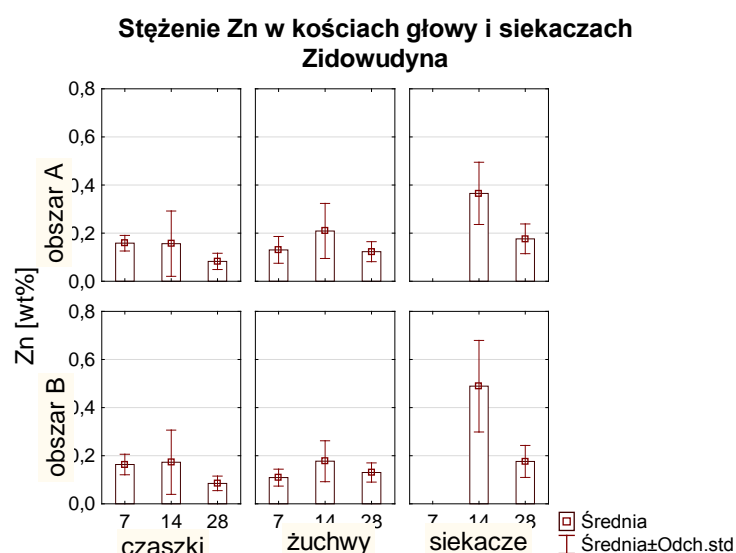


Rys. 43. Stężenie Zn w kościach głowy i siekaczach szczurów, których matkom podawano indinawir

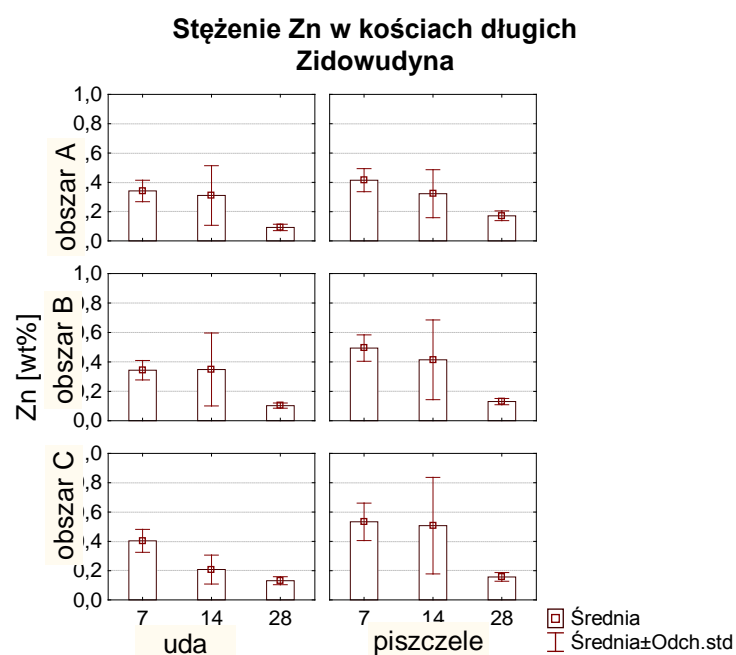


Rys. 44. Stężenie Zn w kościach długich szczurów, których matkom podawano indinawir

Stężenie Zn u szczurów, których matkom podano *zidowudynę* malało z wiekiem szczurów w większości kości (rys. 45 i 46). Różnice istotne statystycznie z $p < 0.05$ pojawiły się w siekaczach oraz w kościach długich między 7- a 14-dniowymi osobnikami. Jedynie w żuchwach osobników z tej grupy koncentracja Zn nie zmieniała się istotnie z wiekiem szczurów.

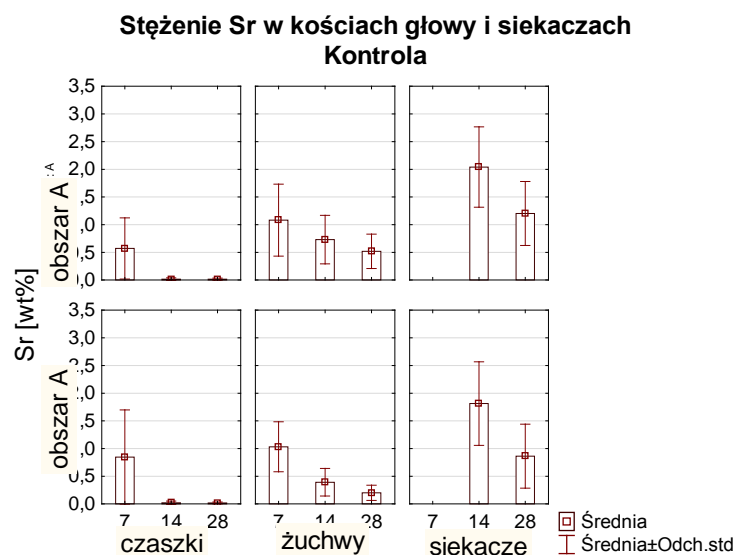


Rys. 45. Stężenie Zn w kościach głowy i siekaczach szczurów, których matkom podawano zidowudynę

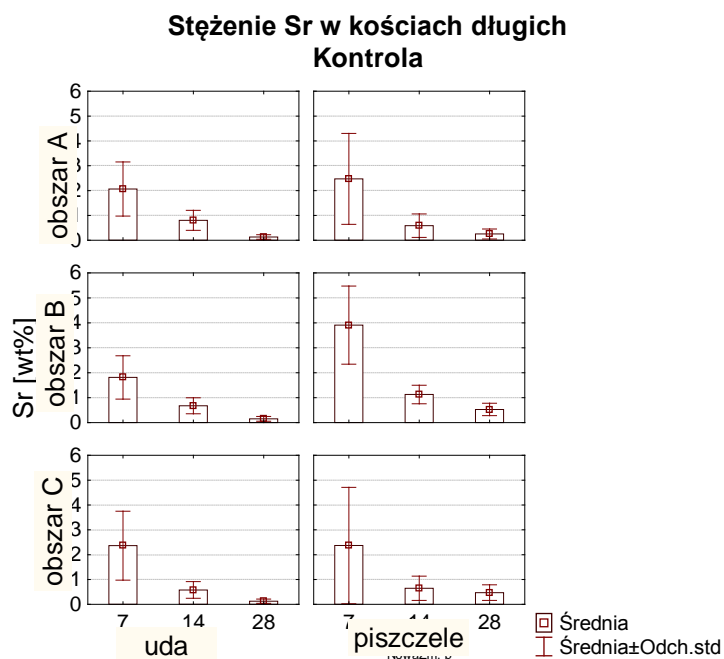


Rys. 46. Stężenie Zn w kościach długich szczurów, których matkom podawano zidowudynę

Porównanie grup wiekowych wykazało najwyższe stężenie Sr w kościach najmłodszych szczurów i silny spadek zawartości tego pierwiastka u starszych osobników kontrolnych z $p < 0.05$ we wszystkich grupach (rys. 47 i 48).

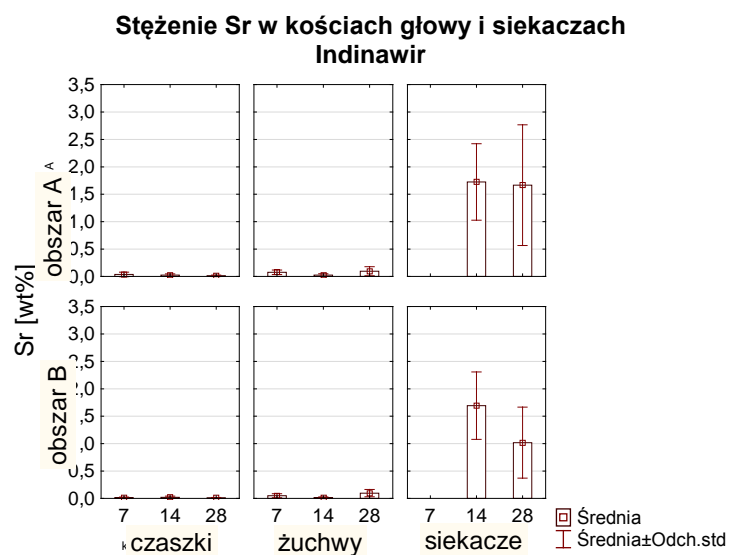


Rys. 47. Stężenie Ca w kościach głowy i siekaczach szczurów kontrolnych

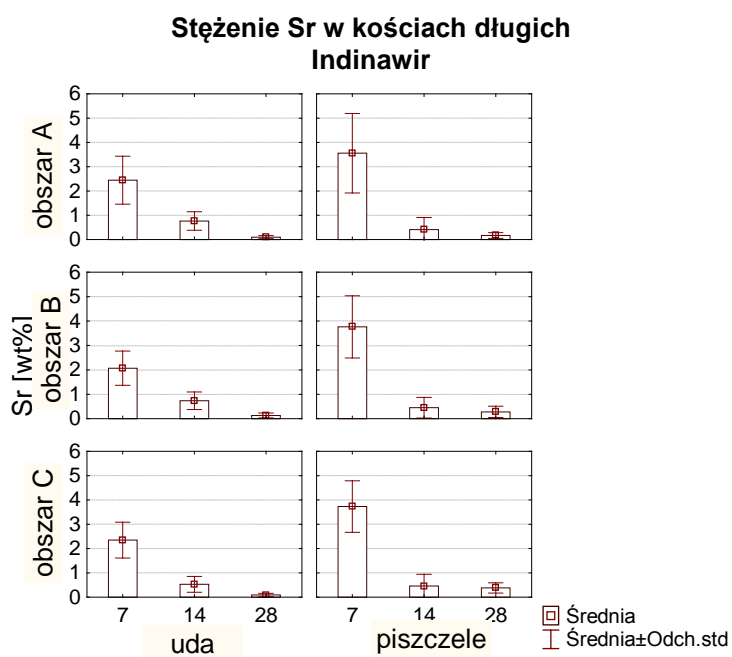


Rys. 48. Stężenie Sr w kościach długich szczurów kontrolnych

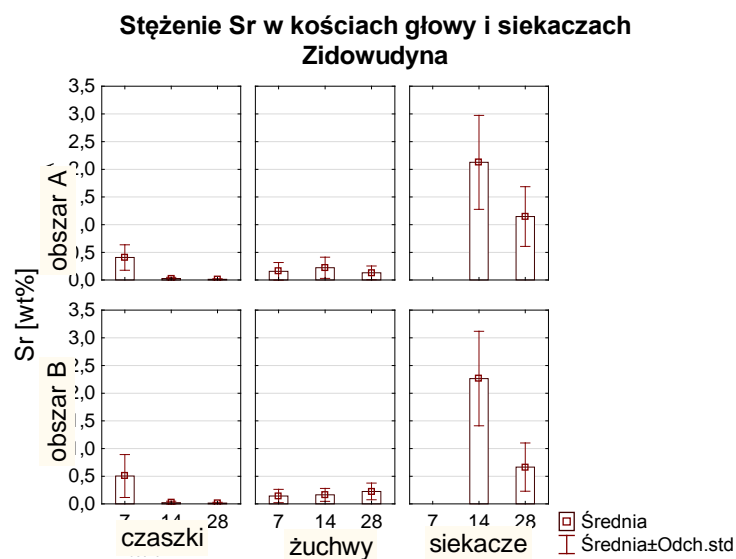
W obu grupach lekowych, tak jak w kontroli, następował spadek zawartości Sr z wiekiem, z wyjątkiem części wewnętrznej siekaczy po *indinawirze* i żuchw po *zidowudynie* (rys. 49-52).



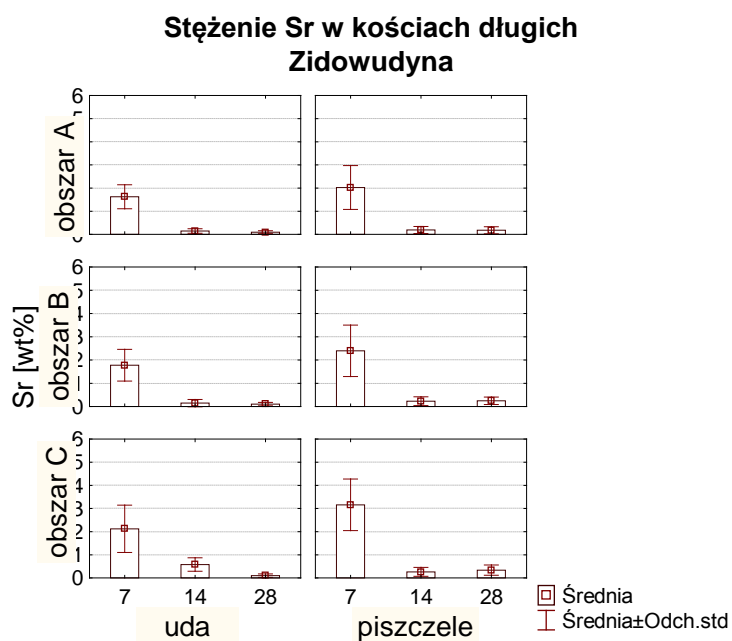
Rys. 49. Stężenie Sr w kościach głowy i siekaczach szczurów, których matkom podawano indinawir



Rys. 50. Stężenie Sr w długich szczurów, których matkom podawano indinawir



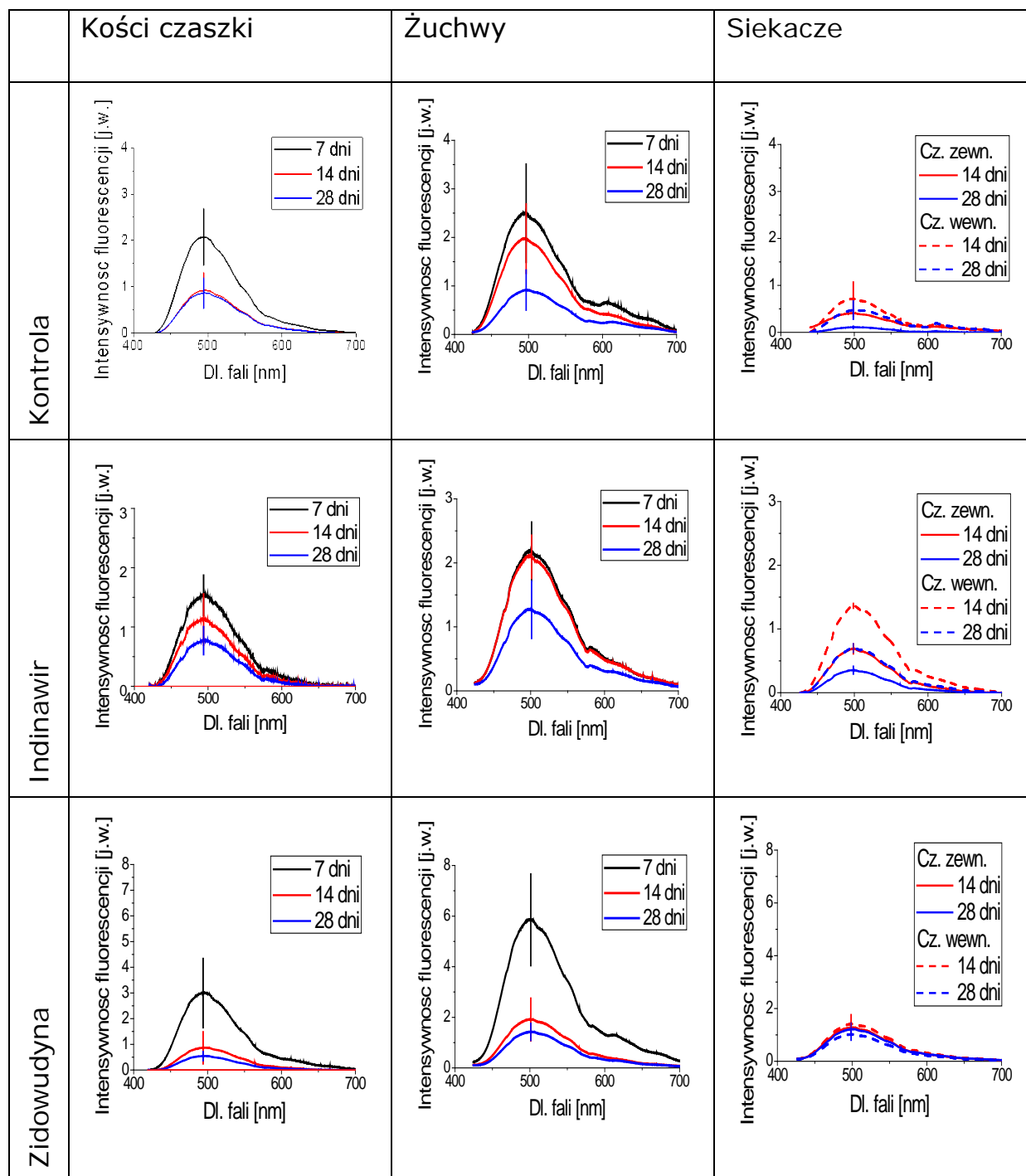
Rys. 51. Stężenie Sr w kościach głowy i siekaczach szczurów, których matkom podawano zidowudynę



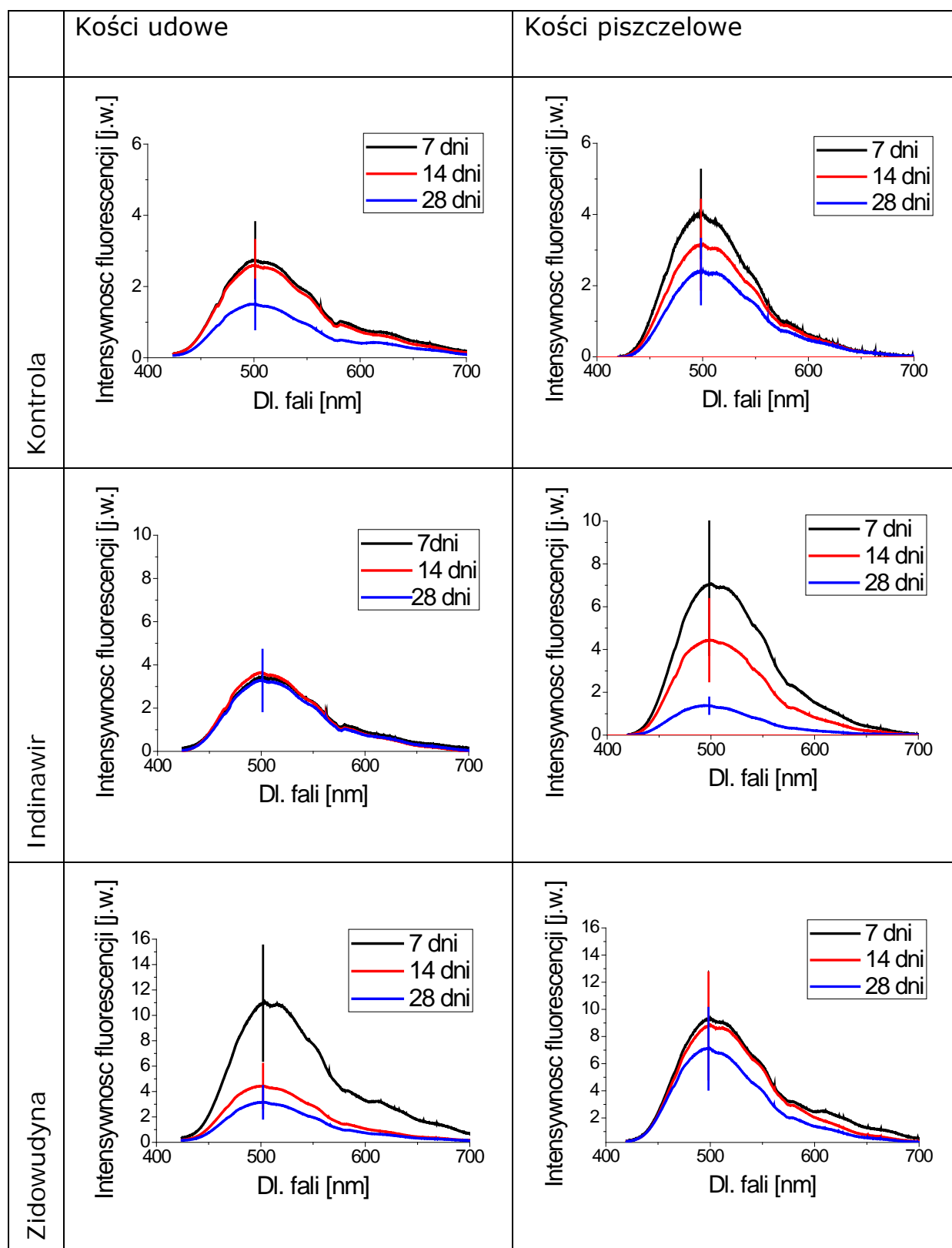
Rys. 52. Stężenie Sr w kościach długich szczurów, których matkom podawano zidowudynę

Wyniki badań metodą LIF

Przedstawione na rys. 53 i 54 wykresy ilustrują zmiany fluorescencji LIF z wiekiem szczurów.



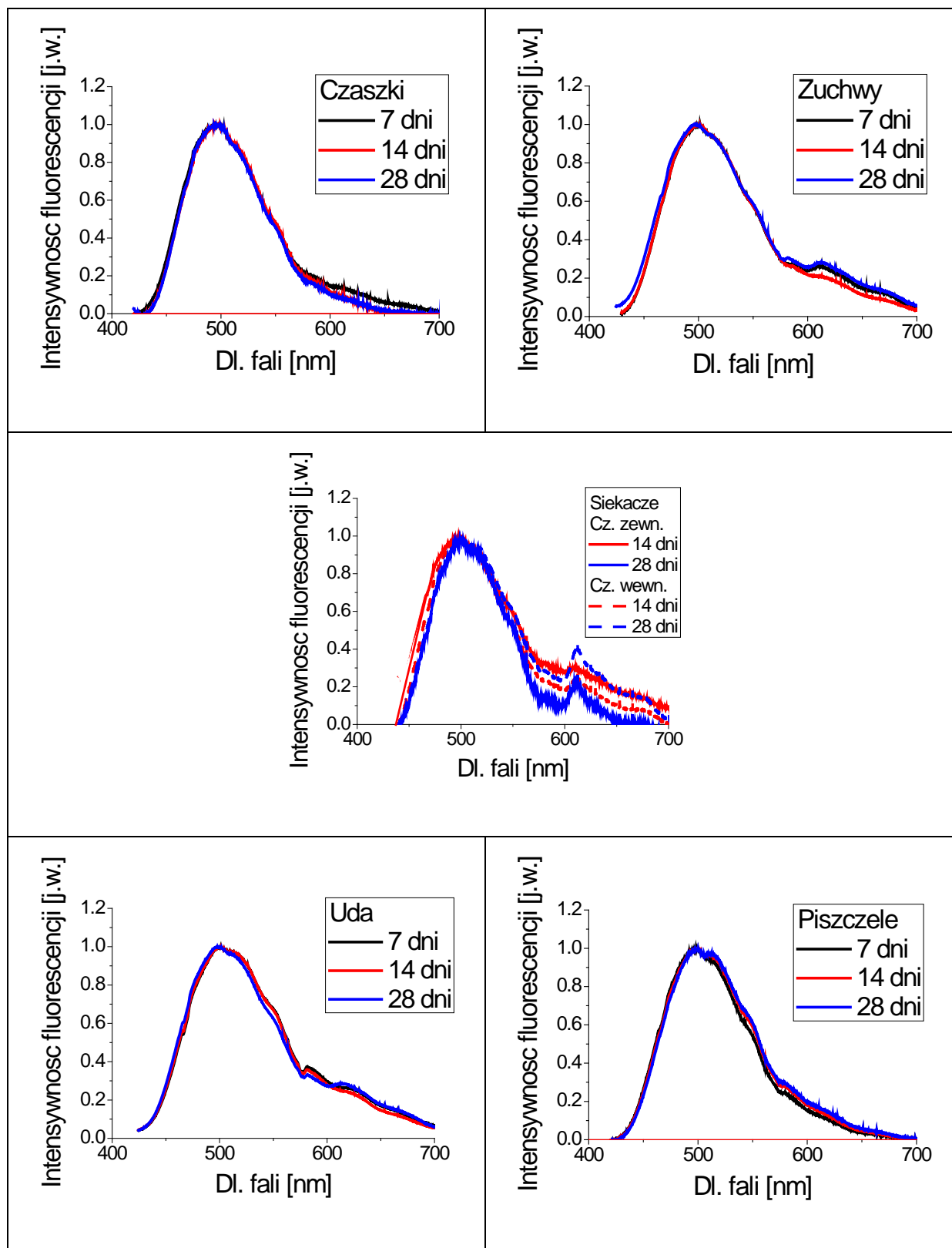
Rys. 53. Widma fluorescencji LIF kości głowy (pokrywy czaszki, żuchwy) oraz siekaczy szczurów 7-, 14- i 28-dniowych kontrolnych, po matczynym podaniu indinawiru oraz po matczynym podaniu zidowudyny



Rys. 54. Widma fluorescencji LIF kości długich (udowych i piszczelowych) szczurów 7-, 14- i 28-dniowych kontrolnych, po matczynym podaniu indinawiru oraz po matczynym podaniu zidowudyny

Pokazują one, że prawie dla wszystkich typów kości we wszystkich grupach lekowych, największa fluorescencja występowała w kościach szczurów 7-dniowych i malała z wiekiem szczurów. Wyjątek stanowiły uda osobników po podaniu *indinawiru* matkom, u których fluorescencja LIF jest taka sama w każdym wieku. Godnym zauważenia jest jednak tempo zmian. W grupie kontrolnej w żuchwach i piszczelach następował stopniowy spadek, natomiast w czaszkach i uda występował duży skok intensywności, przy czym w czaszkach był on widoczny między 7- a 14-dniowymi szczurami, a w udach między 14- a 28-dniowymi. W grupie po aplikacji *indinawiru* skok intensywności występował tylko w żuchwach (między 14- a 28-dniowymi osobnikami), w grupie po podaniu *zidowudyny* w czaszkach (między 7- a 14-dniowymi szczurami – podobnie jak w kontroli) i piszczelach (między 14- a 28-dniowymi).

W celu oceny zmian fluorescencji w zakresie porfiryńowym, tzn. 600-650 nm, znormalizowano powyższe widma do maksimum każdego piku. Wyniki tej części analizy dla kości szczurów kontrolnych przedstawia rys. 55.



Rys. 55. Widma fluorescencji LIF znormalizowane do maksimum pików kości 7-, 14- i 28-dniowych szczurów kontrolnych

Na rysunku wyraźnie zaznacza się pik w okolicy 620 nm, zwłaszcza na widmach siekaczy pochodzących od 28-dniowych szczurów. W kościach

długich praktycznie w ogóle ten pik nie występuje, natomiast jest widoczny w żuchwach osobników 28-dniowych.

Różnice między typami kości.

Wyniki badań metodą XRF

Na rys. 29-52 można zauważyć różnice w stężeniach analizowanych pierwiastków między typami kości.

Jak widać na rys. 29, stężenie Ca w grupie kontrolnej szczurów 7-dniowych było podobne w kościach czaszki i żuchwach. U szczurów 14-dniowych zawartość Ca w tych kościach była również porównywalna, ale istotnie mniejsza niż w siekaczach z $p < 0.05$. Natomiast u osobników najstarszych stężenie Ca było porównywalne w obszarze A siekaczy, obszarze B żuchw i czaszkach. W obszarze B siekaczy i A żuchw zawartość Ca była podobna, wyższa niż w pozostałych ($p < 0.05$).

W kościach udowych było więcej Ca niż w piszczelowych dla szczurów 7-dniowych, relacje te odwróciły się dla szczurów starszych (z $p < 0.05$ dla osobników 14-dniowych) (rys. 30). Podobne stężenie Ca występowały w kościach piszczelowych i kościach głowy we wszystkich grupach wiekowych, natomiast w przypadku kości udowych wyrównywały się z poziomem Ca w kościach głowy u starszych szczurów.

Podobne różnice między typami kości występowały w grupie szczurów po aplikacji lekiem *indinawir* u matek (rys. 31 i 32), choć wyraźnie większe stężenie Ca występuje w czaszkach szczurów 14-dniowych w porównaniu z innymi ($p < 0.01$).

W grupie szczurów, których matkom podawano lek *zidowudynę* (rys. 33 i 34), w czaszkach zaobserwowano dużo większe stężenie Ca niż w żuchwach u 7-dniowych ($p < 0.01$), natomiast mniejsze u starszych szczurów ($p < 0.05$). Wśród kości długich u najmłodszych osobników zawartość Ca była porównywalna, u starszych większa w kościach piszczelowych ($p < 0.05$). Porównując kości głowy i kości długie w tej

grupie, nie widać było wyraźnych, stałych różnic w stężeniu Ca między nimi.

Stężenie Fe u szczurów z grupy kontrolnej (rys. 35) było porównywalne między kośćmi głowy, przy czym obserwowano istotnie wyższy poziom z $p < 0.01$ w obszarze B siekaczy niż w pozostałych kościach. Uda wykazywały niższą zawartość Fe niż piszczele u młodszych osobników ($p < 0.05$), u 28-dniowych różnice te zatarły się i były porównywalne z zawartością w czaszkach i żuchwach (rys. 36). Piszczele charakteryzowały się wyższą koncentracją Fe niż kości głowy u 7- i 14-dniowych osobników ($p < 0.05$), później różnice również nie były widoczne.

Wśród szczurów po traktowaniu *indinawirem* (rys. 37), czaszki i żuchwy wykazywały podobną zawartość Fe między sobą, z wyjątkiem czaszek szczurów 14-dniowych (podobnie jak Ca). Uda i piszczele cechowały się porównywalną ilością Fe, wyższą niż ta w kościach głowy, co widać na rys. 38.

W grupie po podaniu zidowudyny (rys. 39) zawartość Fe w kościach głowy nie różniła się istotnie, z wyjątkiem czaszek szczurów 7-dniowych i części zewnętrznej siekaczy szczurów starszych. Kości długie miały podobną zawartość Fe, porównywalną z tą w kościach głowy (rys. 40).

Analiza zawartości Zn w grupie kontrolnej (rys. 41) nie wykazała różnic między kośćmi czaszek i żuchwami, jedynie siekacze miały wyższy poziom Zn niż pozostałe kości ($p < 0.05$). W udach i piszczelach szczurów kontrolnych poziom Zn był podobny (rys. 42). Wśród szczurów 7- i 14-dniowych widoczne było większe stężenie Zn w kościach długich niż w kościach głowy z $p < 0.05$, jednak u szczurów najstarszych wyrównało się ono.

Podobne różnice między typami kości widoczne były w grupie szczurów po podaniu *indinawiru* (rys. 43 i 44).

W grupie osobników, których matki brały *zidowudynę* (rys. 45), podobnie jak u kontrolnych, kości czaszki i żuchwy cechowały się porównywalną ilością Zn a siekacze większą, zarówno obszar A i B, zwłaszcza u osobników 14-dniowych ($p < 0.05$). Większe stężenie Zn w piszczelach szczurów 7- i 14-dniowych ($p < 0.05$) nie było widoczne u starszych osobników (rys. 46).

Kości głowy osobników kontrolnych były zróżnicowane ze względu na zawartość w nich Sr (rys. 47). Najmniejsze stężenie zaobserwowano w kościach czaszki, największe w siekaczach (w obszarze A i B). Różnice te były istotne z $p < 0.05$. W kościach długich (rys. 48), Sr występował w porównywalnych ilościach, u najmłodszych osobników w dużo większych niż w kościach czaszki i żuchwach ($p < 0.01$). U starszych nastąpiło wyrównanie, jednak pozostał w mniejszym stężeniu niż w zębach ($p < 0.01$).

Szczury po terapii *indinawirem* miały podobną koncentrację Sr w kościach czaszki i żuchwach, dużo mniejszą niż w zębach ($p < 0.0001$), co widać na rys. 49. Pozostałe różnice były takie jak w grupie kontrolnej (rys. 49 i 50).

W grupie po leczeniu *zidowudyną* (rys. 51 i 52) największą uwagę zwróciło znacznie wyższe stężenie Sr w siekaczach w porównaniu z pozostałymi kośćmi ($p < 0.0001$). U najmłodszych szczurów występowały niewielkie różnice między udami a piszczelami. Zawartość Sr była dużo większa z $p < 0.01$ w kościach długich niż w kościach czaszki i żuchwach, jednak u starszych różnice te zaniknęły.

Wyniki badania metodą LIF

Jak wynika z rys. 53 i 54, intensywność fluorescencji LIF zębów szczurów kontrolnych była mniejsza niż intensywność kości czaszki i żuchw, przy czym wielkości te były porównywalne między częścią wewnętrzną a zewnętrzną siekaczy.

W próbkach szczurów 7- i 14-dniowych intensywność fluorescencji była większa w żuchwach niż w czaszkach, w najstarszych szczurach różnice te wyrównały się. Podobnie w kościach długich, intensywność fluorescencji była większa w kościach udowych niż w piszczelowych dla młodszych szczurów.

W grupie po podaniu *indinawiru* różnice między typami kości były podobne, natomiast w grupie po podaniu *zidowudyny*, większą fluorescencją wśród osobników 7-dniowych charakteryzowały się kości udowe niż kości piszczelowe, a wśród szczurów starszych na odwrót. We wszystkich grupach lekowych najmniejszą fluorescencję wykazywały siekacze, największą kości długie.

Różnice między obszarami kości.

Zaobserwowano różnice w stężeniu składników mineralnych między poszczególnymi obszarami na kościach.

W żuchwach i czaszkach szczurów 28-dniowych w większości przypadków nieco większe stężenie Ca występowało w obszarze A w porównaniu z obszarem B z $p < 0.05$ (rys. 29). W kościach długich zawartość Ca była porównywalna między obszarami (rys. 30).

Stężenie Fe w siekaczach było istotnie większe w obszarze B niż w obszarze A, zwłaszcza u szczurów 28-dniowych, gdzie $p < 0.001$, w czaszkach było nieco większe w obszarze B niż A ($p < 0.05$), a w kościach długich było porównywalne (rys. 35 i 36).

Kości głowy nie różniły się istotnie zawartością Zn, natomiast różnice wystąpiły w kościach długich (rys. 41 i 42). W kościach udowych szczurów 7-dniowych najwięcej Zn było w obszarze C ($p < 0.05$), w pozostałych grupach wiekowych zawartość C była porównywalna. W kościach piszczelowych szczurów 7- i 14-dniowych najwięcej Zn było w obszarze B ($p < 0.05$), u starszych nastąpiło wyrównanie.

W żuchwach i siekaczach większym stężeniem Sr cechował się obszar B niż A z $p < 0.05$, w czaszkach nie było różnic istotnych statystycznie (rys. 47). W kościach piszczelowych szczurów 7- i 14-dniowych największe stężenie Sr zanotowano w obszarze B ($p < 0.05$), u najstarszych różnice się wyrównały (rys. 48).

Nie zaobserwowano różnic między obszarami kości w intensywności fluorescencji LIF.

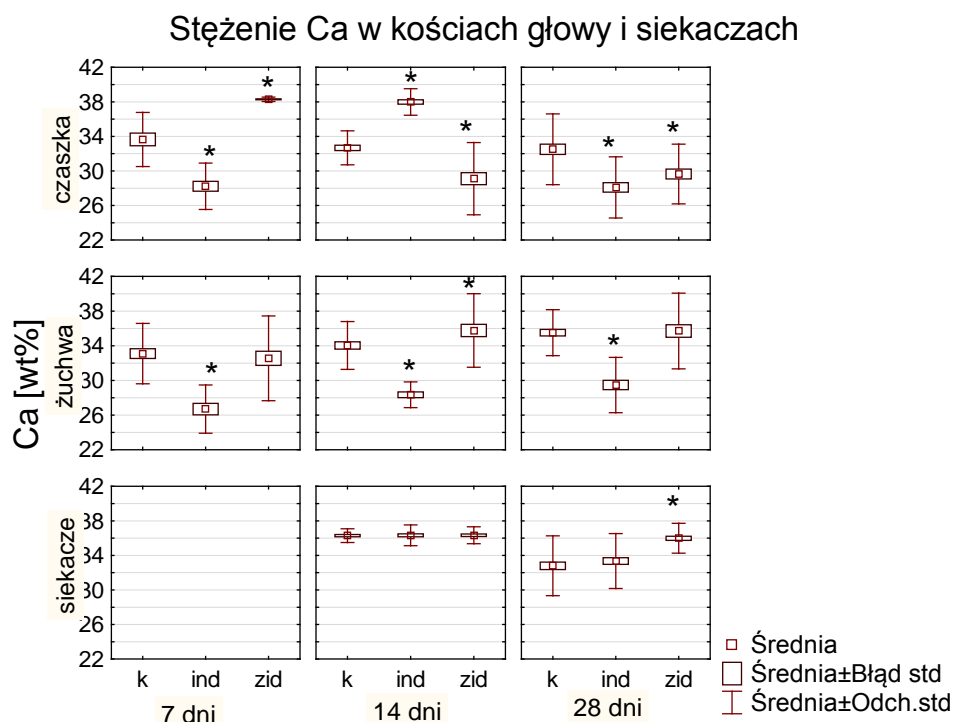
Różnice wynikające z wpływu leków

Wyniki badania metodą XRF

Analiza pierwiastków wykazała inne ich stężenia w grupach zawierających kości potomstwa samic, którym podawano badane leki w stosunku do kości szczurów wolnych od ich wpływu. Rys. 56-63, przedstawiają zawartości pierwiastków w kościach szczurów wszystkich grup lekowych, z wybranych, reprezentacyjnych obszarów. Różnice między stężeniami tych pierwiastków w innych obszarach miały ten sam charakter, dlatego nie zostały w niej przedstawione. Zmiany istotne statystycznie z $p < 0.05$ zostały oznaczone na rysunkach gwiazdką.

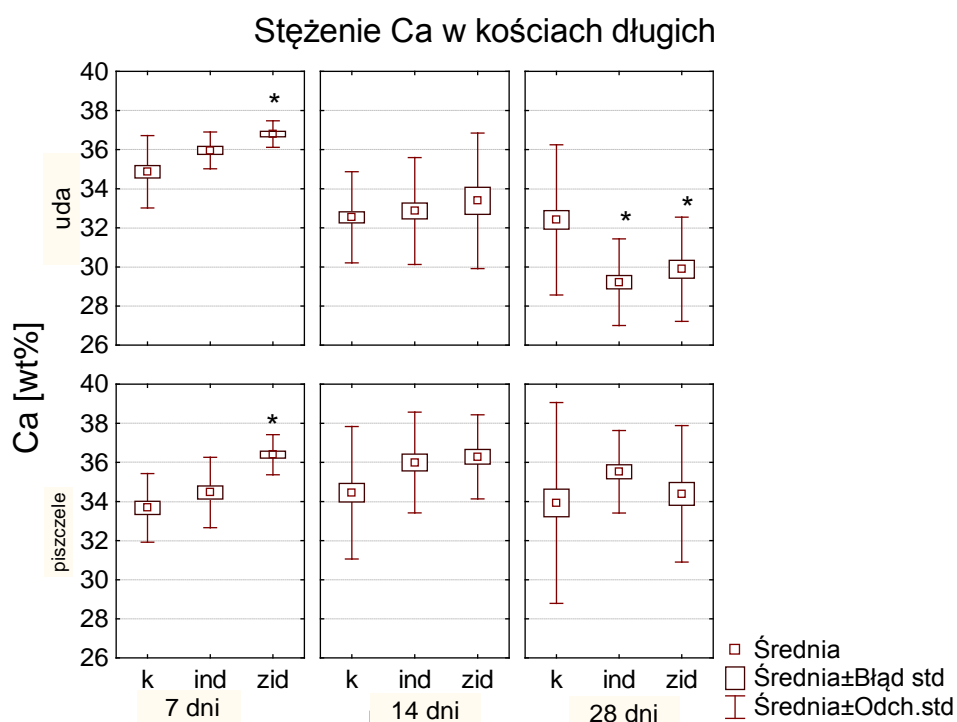
W grupie po podaniu *indinawiru* stężenie Ca w czaszkach szczurów 7-dniowych było istotnie niższe niż w kontroli, u osobników 14-dniowych istotnie wyższe, a u 28-dniowych ponownie się obniżyło. W żuchwach wielkość ta była u wszystkich osobników istotnie mniejsza niż w kontroli, natomiast w siekaczach nie zauważono znaczących zmian (rys. 56). W udach 7- i 14-dniowych noworodków szczurzych zawartość Ca była

porównywalna z kontrolą, podczas gdy u najstarszych zaobserwowano istotne obniżenie poziomu Ca. Piszczelę charakteryzowały się niewiele większą ilością Ca niż kontrola, ale różnice nie były istotne statystycznie (Rys. 57).



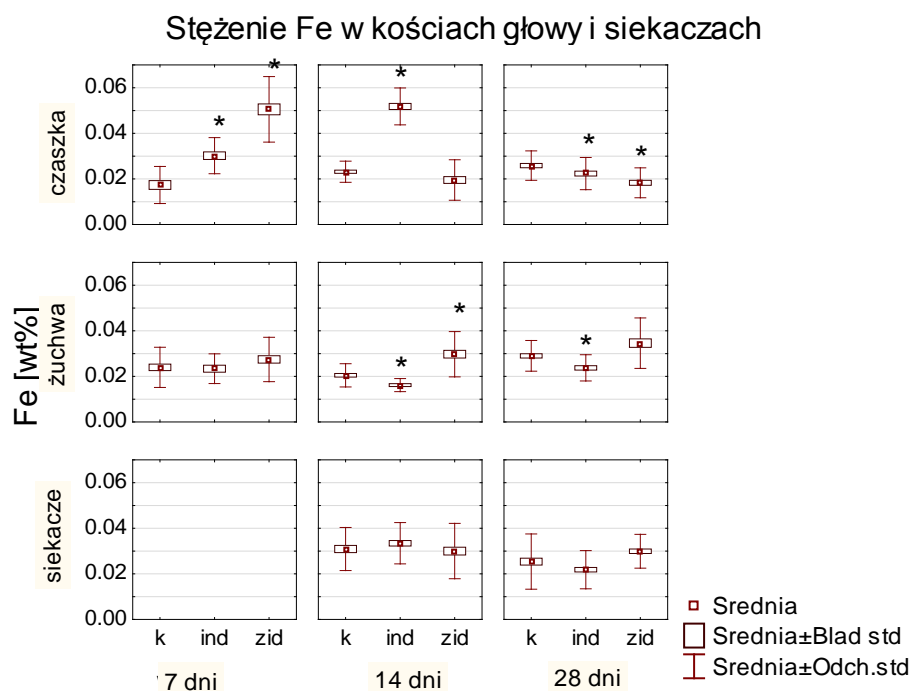
Rys. 56. Stężenie Ca w kościach głowy i siekaczach szczurów z grup lekowych względem kontroli

Czaszki szczurów, których matkom podawano *zidowudynę* cechowały się znacznie zwiększonym stężeniem Ca u 7-dniowych osobników, a obniżonym u starszych szczurów. Zawartość Ca była porównywalna w żuchwach, jedynie u 14-dniowych noworodków lekko podniosła się względem kontroli. Siekacze miały porównywalną z kontrolą ilość Ca u 14-dniowych szczurów, ale podniesioną u 28-dniowych (rys. 56). W udach zauważono wzrost stężenia Ca u 7-dniowych i 14-dniowych osobników (różnice istotnie statystycznie wystąpiły tylko u 7-dniowych) i istotny spadek u najstarszych szczurów. W piszczelach noworodków 7- i 14-dniowych zawartość Ca była istotnie wyższa niż w kontroli, u 28-dniowych nastąpiło wyrównanie (rys. 57).



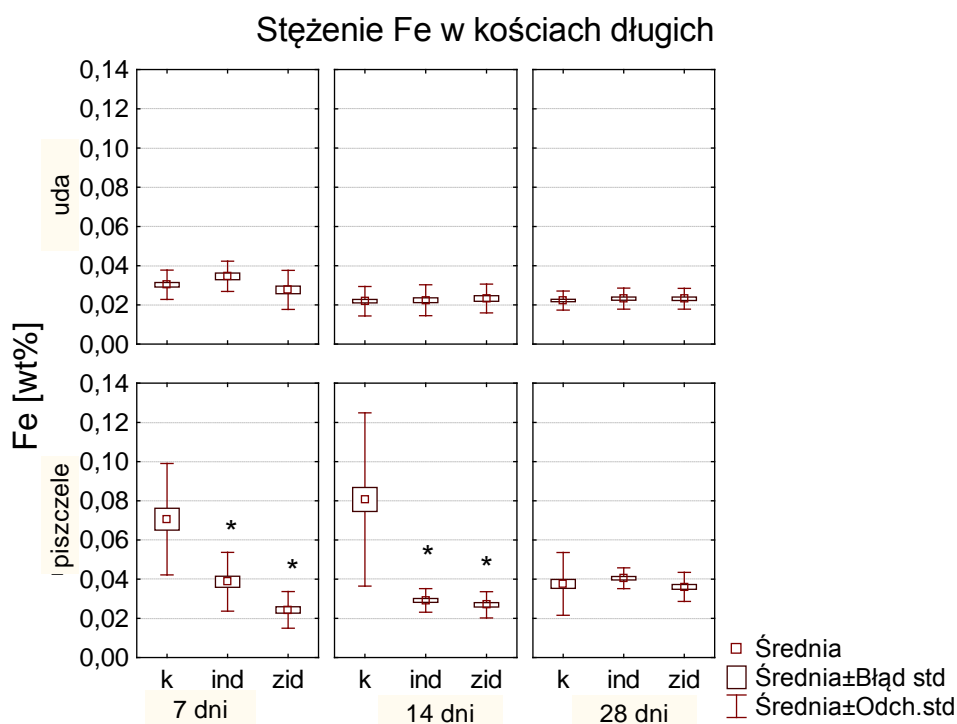
Rys. 57. Stężenie Ca w kościach długich szczurów z grup lekowych względem kontroli (k – kontrola, ind – indinawir, zid – zidowudyna, * - $p < 0.05$)

Zawartość Fe w czaszkach szczurów, których matki otrzymywały *indinawir* była dużo większa niż w grupie kontrolnej u szczurów 7- i 14-dniowych, przy czym u 14-dniowych różnice były znacznie większe. U najstarszych szczurów poziom Fe dążył do wyrównania, ale pozostał nieznacznie, choć istotnie statystycznie niższy niż w kontroli. W żuchwach 7-dniowych noworodków stężenie Fe było porównywalne z kontrolą, ale u starszych zaobserwowano obniżony poziom Fe. W siekaczach oraz udach nie było różnic istotnych statystycznie. Obniżoną zawartość Fe zanotowano w piszczelach osobników 7- i 14-dniowych, natomiast u najstarszych nastąpiło jej wyrównanie (rys. 58 i 59).



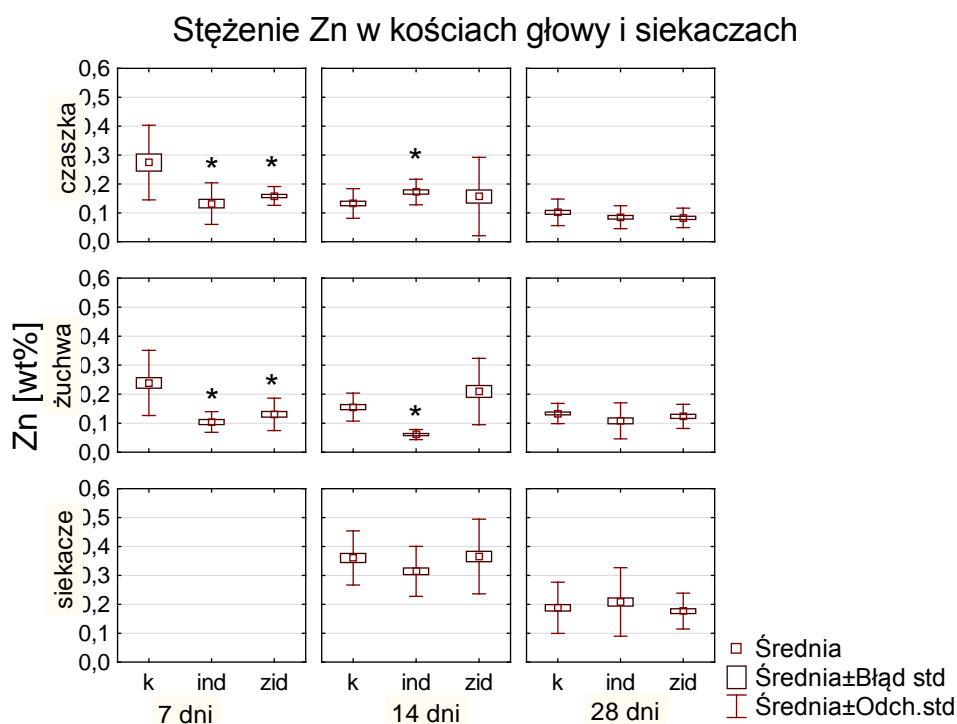
Rys. 58. Stężenie Fe w kościach głowy i siekaczach szczurów z grup lekowych względem kontroli (k – kontrola, ind – indinawir, zid – zidowudyna, * - $p < 0.05$)

Czaszki 7-dniowych szczurów po podaniu *zidowudyny* matkom miały dużo większe stężenie Fe niż kontrolne, u starszych nastąpiło obniżenie, istotne statystycznie u 28-dniowych osobników. W zuchwach zawartość Fe była we wszystkich grupach wiekowych wyższa niż kontroli, ale istotna tylko u 14-dniowych noworodków. Siekacze i uda charakteryzowały się ilością Fe porównywalną do kontroli. Wartość ta była dużo niższa w piszczelach u 7- i 14-dniowych szczurów, u 28-dniowych szczurów nastąpiło jej wyrównanie (rys. 58 i 59).



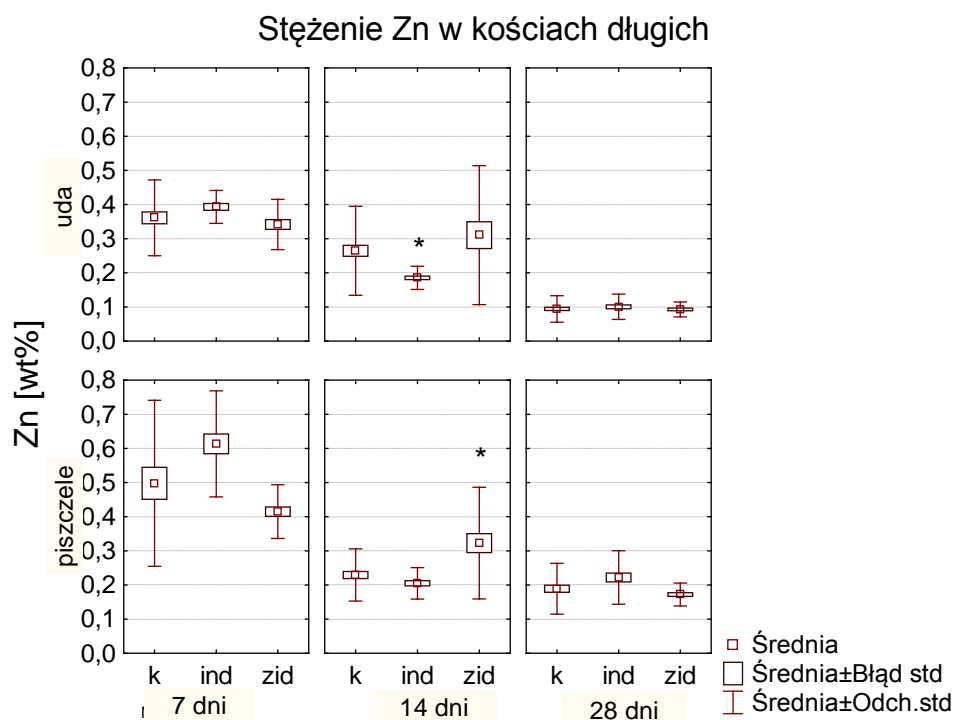
Rys. 59. Stężenie Fe w kościach długich szczurów z grup lekowych względem kontroli (k – kontrola, ind – indinawir, zid – zidowudyna, * - $p < 0.05$)

Zawartość Zn w czaszkach 7-dniowych szczurów, których matkom podawano *indinawir* była mniejsza w stosunku do kontroli, u starszych była ona bliższa wartości występującej w grupie kontrolnej. W żuchwach zauważalne było znaczne obniżenie poziomu Zn u 7- i 14-dniowych osobników, wyrównujące się u najstarszych. W siekaczach 14-dniowych noworodków poziom Zn był nieco niższy niż w kontroli, ale nie istotny, a u 28-dniowych porównywalny do kontroli (rys. 60). W udach szczurów 7-dniowych stężenie Zn niewiele różniło się od grupy kontrolnej, u starszych wielkość ta spadała z wiekiem szybciej niż w kontroli (u 14-dniowych szczurów istotnie niższa), ale u najstarszych wyrównała się z kontrolą. W piszczelach nastąpiły niewielkie, nie istotne oscylacje poziomu Zn względem grupy kontrolnej (rys. 61).



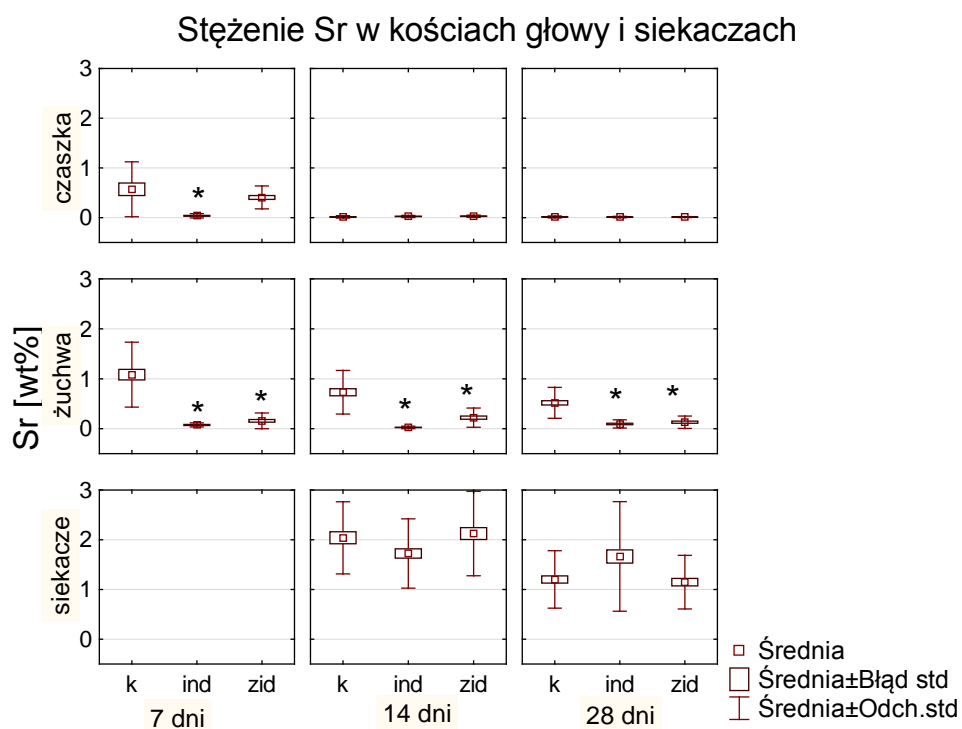
Rys. 60. Stężenie Zn w kościach głowy i siekaczach szczurów z grup lekowych względem kontroli (k – kontrola, ind – indinawir, zid – zidowudyna, * - $p < 0.05$)

W czaszkach i żuchwach 7-dniowego potomstwa szczurzy, którym aplikowano *zidowudynę* nastąpiło znaczne obniżenie stężenia Zn względem kontroli, które jednak wyrównało się u najstarszych osobników. Zawartość Zn była porównywalna z kontrolą w siekaczach (rys. 60). W udach nastąpiły lekkie oscylacje wokół stężenia kontrolnego, w piszczelach oscylacje te były większe, ale miały ten sam charakter (obniżenie u 7-dniowych, podwyższenie u 14-dniowych i lekkie obniżenie u 28-dniowych szczurów (rys. 61).



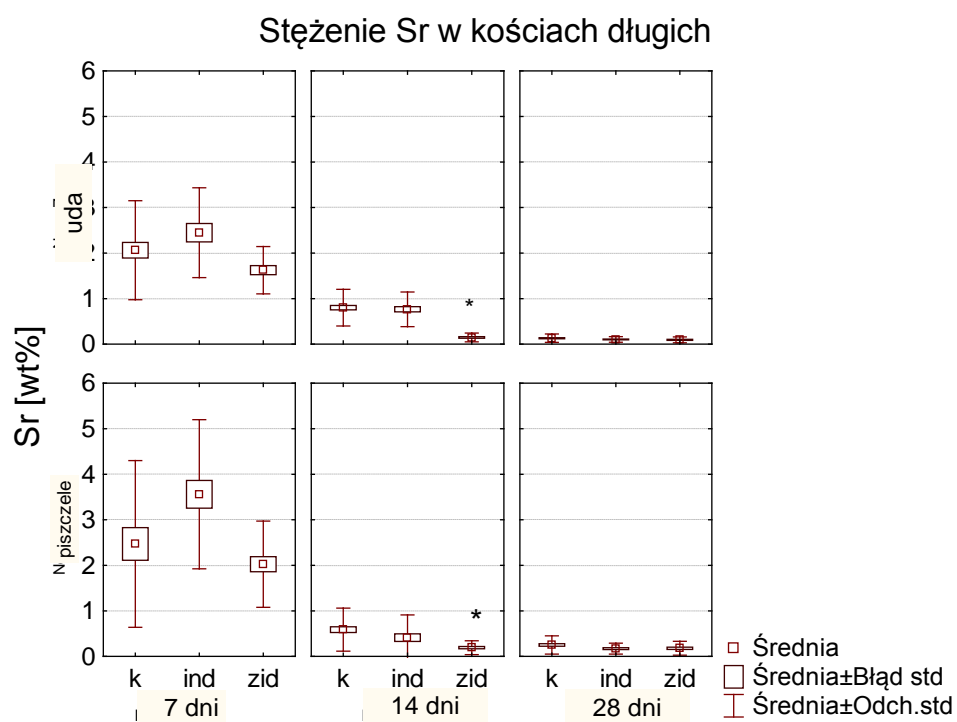
Rys. 61. Stężenie Zn w kościach długich szczurów z grup lekowych względem kontroli (k – kontrola, ind – indinawir, zid – zidowudyna, * - $p < 0.05$)

Stężenie Sr w czaszkach szczurów 7-dniowych po aplikacji *indinawirem* było mniejsze niż w kontroli, u starszych nastąpiło wyrównanie jego poziomu, podczas gdy w żuchwach było znacznie niższe we wszystkich grupach wiekowych. W siekaczach widoczne były niewielkie, nie istotne zaburzenia zawartości Sr (rys. 62). W udach poziom Sr był porównywalny z kontrolą, w piszczelach 7-dniowych osobników lekko wyższy, który u starszych malał, przy czym różnice nie były istotne statystycznie (rys. 63).



Rys. 62. Stężenie Sr w kościach głowy i siekaczach szczurów z grup lekowych względem kontroli (k – kontrola, ind – indinawir, zid – zidowudyna, * - $p < 0.05$)

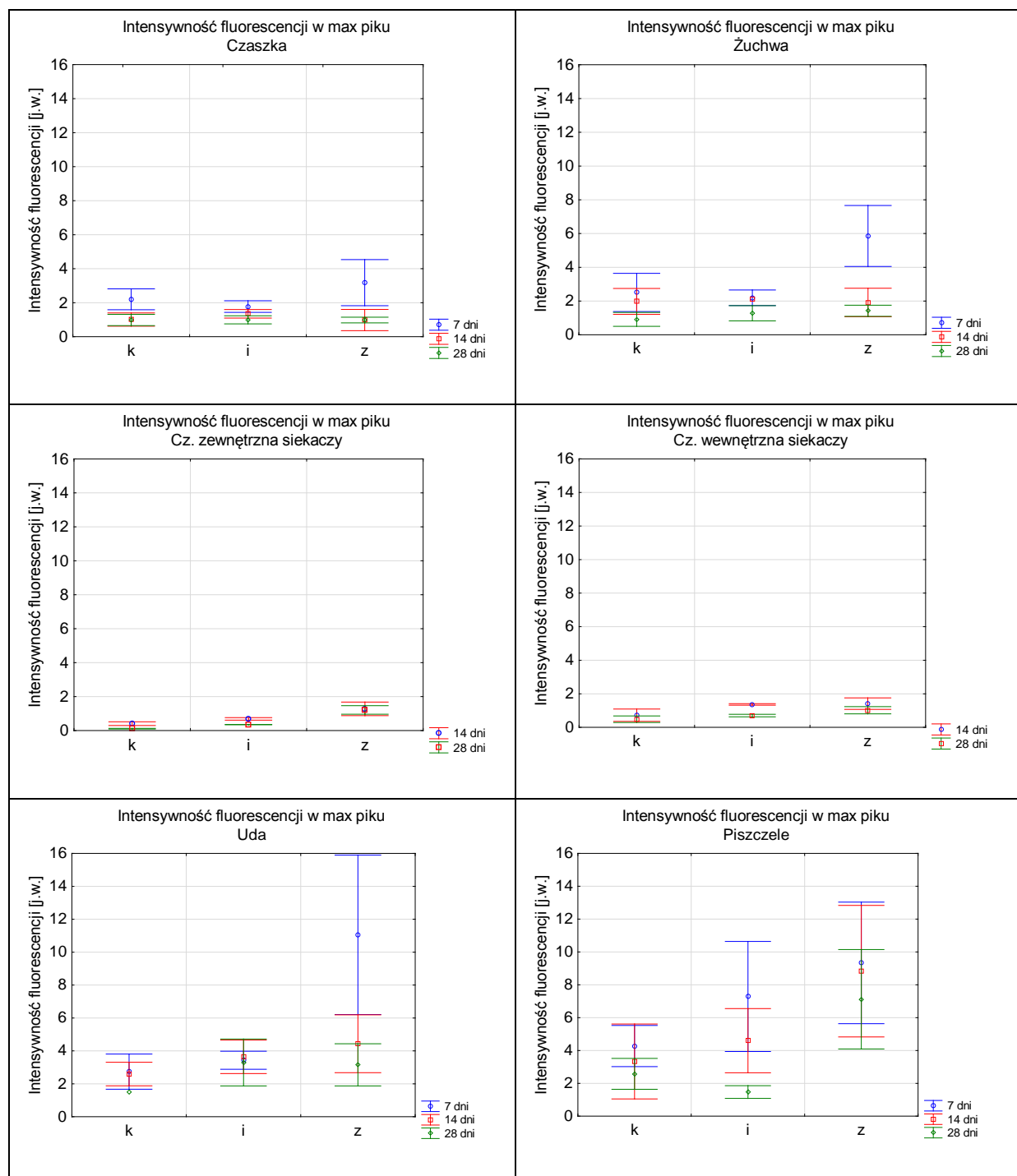
Czaszki siedmiodniowego potomstwa szczurzy, którym podawano *zidowudynę* cechowały się lekko obniżonym względem kontroli, ale nie istotnym poziomem Sr, u starszych osobników nastąpiło wyrównanie. W żuchwach zaobserwowano we wszystkich grupach wiekowych istotne obniżenie zawartości Sr, podobnie jak po aplikacji *indinawiru* (Rys. 62). W siekaczach wielkość ta była porównywalna z kontrolą. W udach i pieszczelach szczurów 7- i 14-dniowych stężenie Sr było obniżone, a u najstarszych wyrównane (Rys. 63).



Rys. 63. Stężenie Sr w kościach długich szczurów z grup lekowych względem kontroli (k – kontrola, ind – indinawir, zid – zidowudyna, * - $p < 0.05$)

Wyniki badania metodą LIF

W celu zobrazowania różnic we fluorescencji między kośćmi szczurów po aplikacji lekami antyretrowirusowymi w stosunku do kontroli, utworzono wykresy intensywności fluorescencji LIF w maksimum pików, tj. dla długości fali 500 nm, które są przedstawione na rys. 64.



Rys. 64. Średnie intensywności fluorescencji LIF w maksimum pików w kościach szczurów grup lekowych (i – indinawir, z – zidowudyna) względem kontroli (k)

Z wykresów na rys. 64 wynika, iż intensywność fluorescencji po podaniu *indinawiru* matkom była porównywalna do kontroli we wszystkich kościach w każdym wieku. W siekaczach wielkość ta była wyższa w stosunku do kontroli, zarówno dla szczurów 14-, jak i 28-dniowych. Stąd można wywnioskować, iż *indinawir* nie wpływa znacząco na macierz organiczną kości.

Wpływ *zidowudyny* jest dużo większy, zwłaszcza u najmłodszych osobników. We wszystkich kościach zanotowano wzmocnienie fluorescencji w porównaniu z grupą kontrolną. W tab. 7 zestawiono średnie wartości intensywności fluorescencji dla długości fali 500 nm kości 7-dniowych szczurów kontrolnych oraz wartości, o które nastąpiła zmiana intensywności LIF w kościach szczurów po podaniu *indinawiru* i *zidowudyny* w stosunku do kontroli.

7 dni	Intensywność LIF dla 500 nm w grupie kontrolnej	Zmiana w grupie po podaniu Indinawiru w stosunku do kontroli	Zmiana w grupie po podaniu Zidowudyny w stosunku do kontroli
Czaszki	2.05±0.61	-0.43	0.98
Żuchwy	2.50±1.00	-0.32	3.35
Uda	2.74±1.07	0.69	8.31
Piszczele	4.01±1.25	3.01	5.06

Tab. 7. Średnie w kościach 7-dniowych szczurów kontrolnych oraz zmiany średniej intensywności fluorescencji LIF w maksimum pików w grupach lekowych względem kontroli

Jak widać w tab. 7, największa różnica w intensywności LIF między kośćmi szczurów po podaniu *zidowudyny* a kontrolnymi wystąpiła w kościach długich, zwłaszcza w kościach udowych – aż o 8.31 j.w., czyli ponad 4-krotnie. W kościach szczurów starszych różnice nie były tak istotne, w czaszkach, żuchwach i udach intensywności były porównywalne, w siekaczach i piszczelach pozostały większe niż w szczurach kontrolnych. Z powyższych porównań wynika, iż podana samicom szczurzym *zidowudyna*

istotnie wzmocniła fluorescencję LIF w tkance kostnej potomstwa szczurzym.

Oprócz zmian we fluorescencji w całym zakresie widma, sprawdzono również jak aplikacja lekami u matek wpłynęła na fluorescencję w zakresie 600-650 nm pochodzącą od porfiry. W związku z tym wyznaczono współczynniki I_{ind}/I_{kontr} oraz I_{zid}/I_{kontr} , które wyliczono dzieląc intensywność maksimum pików porfiryнового 620 nm widma kości szczurów, których matkom podawano *indinawir* i *zidowudynę*, odpowiednio, przez maksimum pików porfiryнового w okolicach 620 nm widma kości szczurów kontrolnych. Wyniki tej analizy przedstawione są w tab. 8.

Kość	Wiek	$I(620)_{ind}/I(620)_{kontr}$	$I(620)_{zid}/I(620)_{kontr}$
czaszka	7 dni	0.77	1.36
	14 dni	0.69	1.00
	28 dni	0.51	0.89
żuchwa	7 dni	0.77	0.85
	14 dni	1.00	0.91
	28 dni	0.85	0.75
k. udowe	7 dni	0.77	1.00
	14 dni	0.66	0.77
	28 dni	0.69	0.69
k. piszczelowe	7 dni	1.43	2.08
	14 dni	1.04	1.40
	28 dni	0.78	1.03
cz. zewnętrzna siekaczy	14 dni	0.40	0.63
cz. wewnętrzna siekaczy		0.64	0.74
cz. zewnętrzna siekaczy	28 dni	0.47	0.48
cz. wewnętrzna siekaczy		0.38	0.47

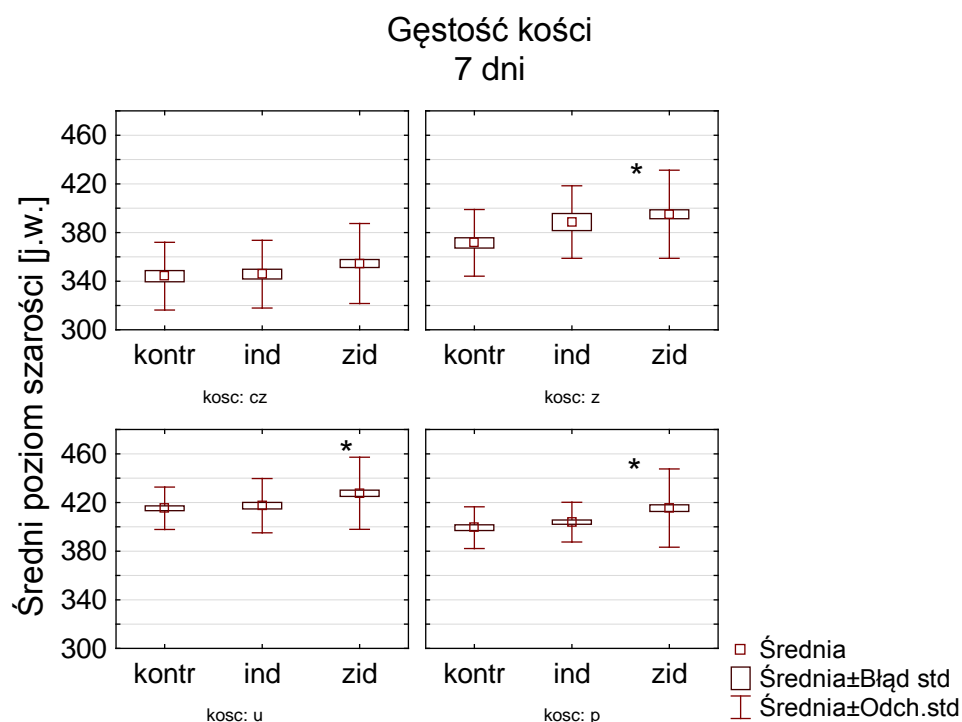
Tab. 8. Stosunek intensywności fluorescencji LIF w maksimum pików porfiryнового w grupach lekowych (indinawir i zidowudyna) do intensywności fluorescencji LIF w maksimum pików porfiryнового w kontroli

Przedstawione w tab. 8 parametry wskazują obniżenie fluorescencji w zakresie powyżej 600 nm we wszystkich kościach osobników, których matkom podawano *indinawir* (z wyjątkiem piszczeli szczurów 7-dniowych), przy czym największy spadek obserwujemy w przypadku siekaczy. W grupie szczurów, których matkom aplikowano *zidowudynę*, można zauważyć wzmocnienie emisji LIF w piszczelach (zwłaszcza 7-dniowych noworodków). W czaszkach i żuchwach parametr ten oscyluje wokół wartości zbliżonych do kontroli, w udowych jest mniejszy dla szczurów 14- i 28-dniowych, w siekaczach, podobnie jak dla *indinawir*, obserwujemy znaczne obniżenie fluorescencji (nawet o 50% w siekaczach najstarszych szczurów).

Wyniki badania metodą Radiografii cyfrowej

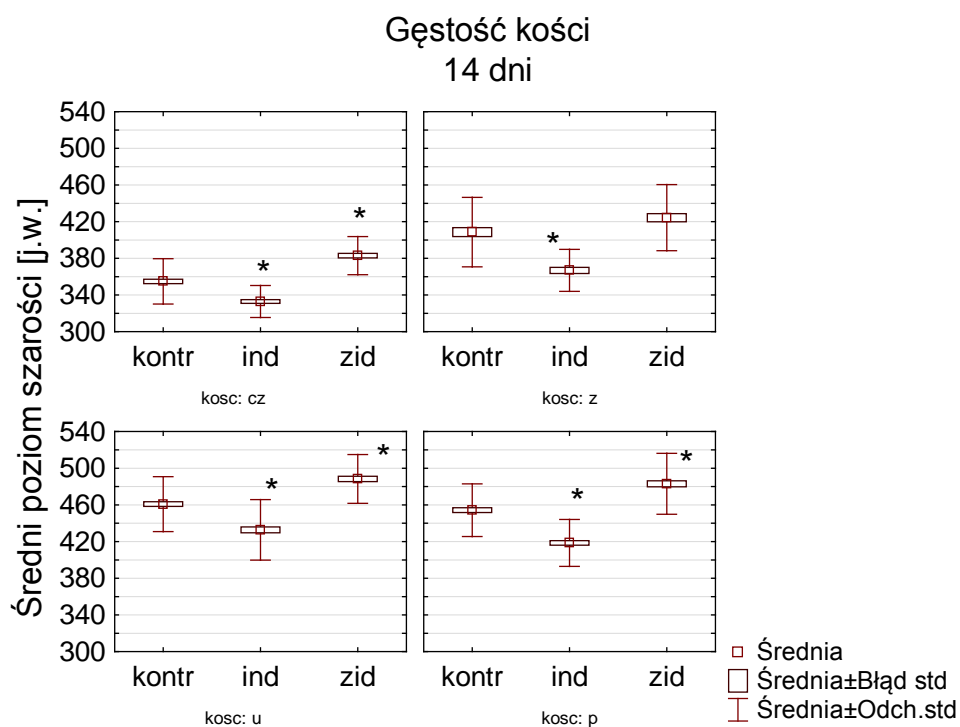
Na rys. 65-67 przedstawione są wykresy średnich poziomów szarości w danych ROI w kościach czaszki, żuchw i kościach długich szczurów 7-dniowych, 14-dniowych i 28-dniowych wszystkich grup lekowych. Na rysunkach nie przedstawiono wykresów poziomów szarości dla siekaczy, ponieważ wielkości te nie różniły się znacząco w obrębie grup.

Porównanie średnich poziomów szarości kości szczurów 7-dniowych pokazuje zbliżoną ich wartość między grupą kontrolną a grupą po podaniu *indinawiru*, natomiast w kościach szczurów po aplikacji *zidowudyną* zanotowano większą wartość poziomu szarości, przy czym różnice te są istotne statystycznie w żuchwach i obu typach kości długich ($p < 0.001$), co widać na rys. 65.



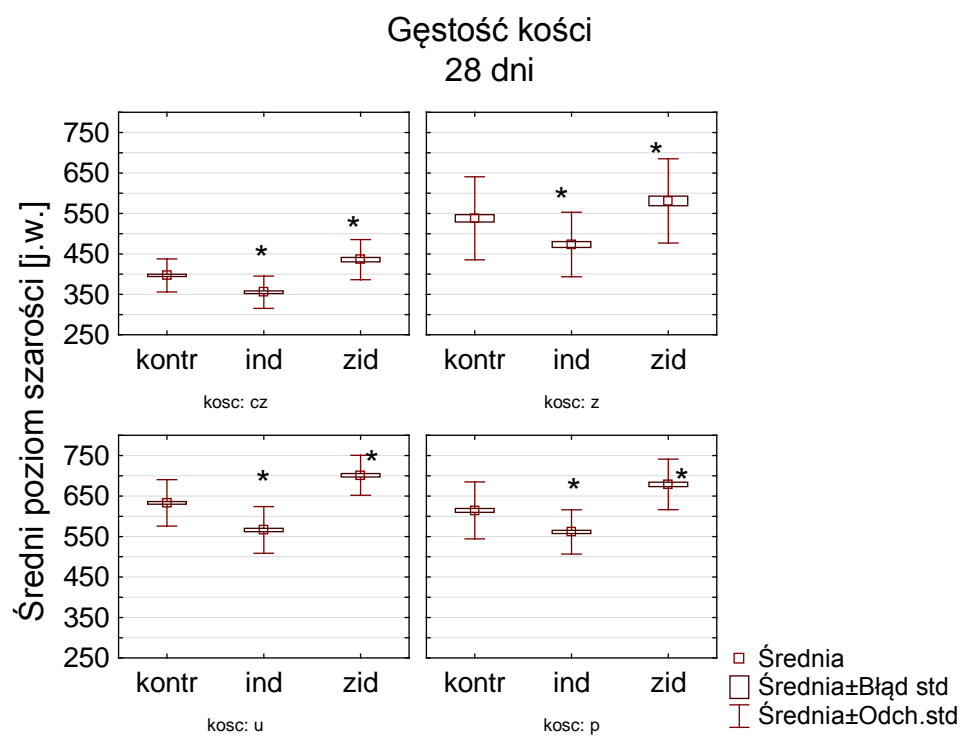
Rys. 65. Średni poziom szarości ROI w czaszkach (cz), żuchwach (z), udach (u) i piszczelach (p) 7-dniowych szczurów w grupach lekowych (ind – indinawir, zid – zidowudyna) względem kontroli (kontr)

W grupie szczurów 14-dniowych uwidocznił się wpływ *indinawiru* podanego matkom szczurów, który przyczynił się do statystycznie istotnego ($p < 0.001$) obniżenia średniego poziomu szarości we wszystkich kościach względem kości szczurów kontrolnych (rys. 66). Jednocześnie w kościach szczurów po podaniu *zidowudyny* matkom utrzymał się wyższy w stosunku do kontroli poziom szarości, z istotnością statystyczną $p < 0.001$ w żuchwach, kościach udowych i piszczelowych.



Rys. 66. Średni poziom szarości ROI w czaszkach (cz), żuchwach (z), udach (u) i piszczelach (p) 14-dniowych szczurów w grupach lekowych (ind – indinawir, zid – zidowudyna) względem kontroli (kontr)

W najstarszej grupie szczurów charakter zmian średniego poziomu szarości pozostał taki sam – w grupie po matczynej aplikacji *indinawirem* wartość ta była istotnie niższa niż w grupach kontrolnych, natomiast w grupie po matczynej aplikacji *zidowudyną* – znacząco wyższa (rys. 67). Wszystkie różnice między grupą po podaniu *indinawiru* a kontrolną są istotne z $p < 0.0001$, natomiast różnice między grupą po podaniu *zidowudyny* a kontrolną są mniejsze ($p < 0.05$).



Rys. 67. Średni poziom szarości ROI w czaszkach (cz), żuchwach (z), udach (u) i piszczelach (p) 28-dniowych szczurów w grupach lekowych (ind – indinawir, zid – zidowudyna) względem kontroli (kontr)

DYSKUSJA WYNIKÓW

Zrozumienie procesów zachodzących w organizmie człowieka jest niezwykle ważne w świetle badań z zakresu fizyki medycznej, biotechnologii i medycyny. W pierwszej kolejności zostaną zanalizowane zmiany zawartości wybranych pierwiastków chemicznych oraz zmiany intensywności fluorescencji składników organicznych w kościach i zębach szczurów z wiekiem oraz między typami kości i pomiędzy poszczególnymi ich obszarami w pierwszym miesiącu ich życia. Następnie zostanie przedyskutowany wpływ leków antyretrowirusowych: *indinawir* i *zidowudyna* na macierz nieorganiczną i organiczną tkanki kostnej noworodków i młodych osobników, których matkom podawano w czasie ciąży analizowane leki. Substancje te są obecnie stosowane u ciężarnych kobiet zarażonych wirusem HIV w celu zapobiegnięcia przeniesienia wirusa na dziecko [1-3]. Z uwagi na ich potwierdzoną toksyczność [4-14], należą one do tzw. Kategorii C leków zatwierdzonych przez FDA (*ang. Food and Drug Administration*), co oznacza, że mogą być przepisane jedynie w sytuacji, gdy potencjalna korzyść przewyższa potencjalne ryzyko. Nie skupiano się dotychczas na wpływie, jaki leki stosowane u organizmów dorosłych mogą wywierać na stan tkanki kostnej potomstwa. Stąd zainteresowanie powyższym problemem.

Różnice w macierzy nieorganicznej i organicznej związane z wiekiem szczurów.

Macierz nieorganiczna

Zmiany w macierzy nieorganicznej były obserwowane przez pryzmat zmian w składzie pierwiastkowym.

Zawartość Ca w kościach szczurów zmieniała się niejednakowo w różnych kościach. W czaszkach zaobserwowano nieznaczny spadek, natomiast w żuchwach niewielki wzrost tej wartości. W udach poziom Ca spadał między osobnikami 7- a 14-dniowymi, potem ustabilizował się, a w piszczelach utrzymywał się na stałym poziomie (rys. 29 i 30). Wyniki

badania stężenia Ca w kościach szczurzych nie wykazują ciągłego wzrostu stężenia Ca z wiekiem, mimo iż zostały przeprowadzone u noworodków (7- i 14-dniowe szczury) i osobników młodocianych (28-dniowe). Gęstość masy kostnej (BMD, *ang. bone mass density*), która jest wyznacznikiem odporności kości na złamania, wzrasta u młodych osób osiągając maksimum w wieku ok. 30 lat, czyli u młodych, ale dorosłych osób [79]. Jednak na gęstość kości wpływa nie tylko zawartość Ca, ale również innych pierwiastków budujących szkielet, a głównie P, którego stężenie w kości referencyjnej SRM BM wynosiło ok. 12%, czyli prawie połowę zawartości Ca. Jak to było omówione wcześniej, wyników ilościowych uzyskanych dla P nie można interpretować, ponieważ energia promieniowania charakterystycznego P (2 keV) jest zbyt niska, by osiągnąć dobrą wydajność układu. Zaobserwowano jednak, iż w miejscach, w których stężenie Ca było mniejsze niż w pozostałych, zawartość P była większa. Z tego wynika, iż mocna, odporna na złamania, struktura kości nie wynika jedynie z dużej zawartości Ca, ale także pozostałych pierwiastków, głównie P. Poza tym, jak donoszą najnowsze badania, siła i odporność kości nie jest związana jedynie z BMD i zawartością minerałów w kościach. Wpływ na wytrzymałość kości ma również metabolizm składników organicznych, np. tłuszczów [80]. Jednocześnie zaobserwowane zmiany w poziomie Ca z wiekiem w różnych kościach potwierdzają fakt wymiany jonów [24], co jest związane z nasiloną w tym okresie wzrostem i rozbudową kości.

Zawartość Fe była w większości kości na porównywalnym poziomie we wszystkich grupach wiekowych (rys. 35 i 36). Jedynie w części zewnętrznej siekaczy oraz kościach piszczelowych 14-dniowych szczurów zaobserwowano podwyższenie poziomu Fe. Jest to związane z wysokim zapotrzebowaniem na składniki odżywcze i tlen niesione przez hem w siekaczach. Wyższa zawartość Fe w piszczelach może wynikać z faktu, iż kości te są dłuższe niż udowe i to na nich opiera się ciało szczura podczas poruszania, muszą więc być solidnie zaopatrzone w tlen podczas

początkowej fazy wzrostu. Ustabilizowana zawartość Fe w pozostałych kościach jest prawdopodobnie związana z toksycznością żelaza w sytuacji jego podwyższonego stężenia. W celu jego regulacji organizmy wykształciły mechanizmy regulujące jego homeostazę [29].

Najwyższa zawartość pierwiastków śladowych Zn i Sr zaobserwowana w kościach najmłodszych szczurów (rys. 41-42 i 47-48) i jej późniejszy spadek z wiekiem szczurów wynika z kluczowej roli tych pierwiastków w procesie budowy kości, który najsilniej przebiega u najmłodszych szczurów. Cynk stymuluje pracę osteoblastów oraz hamuje funkcjonowanie osteoklastów powodując w ten sposób wzrost masy kostnej [35]. Jednocześnie reguluje syntezę protein i ekspresję genów odpowiedzialnych za formację kości w komórkach osteoplastycznych i resorpcji kości w osteoklastycznych [34]. Rola Sr natomiast nie jest do końca poznana i wyjaśniona, natomiast wiemy, iż może pełnić znaczącą rolę w rozwoju kości, ponieważ jego podaż stymuluje formowanie kości i wzrost objętości skalcyfikowanej kości oraz ogranicza resorpcję kości zapobiegając w ten sposób utracie masy kostnej [39-40].

Macierz organiczna

Zmiany w macierzy organicznej uwydatniały się w zmianach fluorescencji. Fluorescencja LIF była najwyższa u najmłodszych osobników i spadała z wiekiem szczurów (rys. 53 i 54). Tendencja ta była zachowana w grupie szczurów zdrowych, jak i tych, których matkom podawano leki antyretrowirusowe. Oznacza to, iż wpływ wieku na obecność endogennych fluoroforów jest większy niż wpływ leków. Fluorescencja malała z wiekiem noworodków prawdopodobnie z rosnącą mineralizacją kości. U szczurów najmłodszych struktura kości jest mniej zbita niż u starszych ze względu na niezakończony proces wykształcania się składników mineralnych. W związku z tym odsłonięte są endogenne fluorofory, które dają widmo fluorescencji. Jednocześnie proces wzrostu najsilniejszy w pierwszym

okresie endogenezy implikuje wysoką zawartość fluoryzujących białek i enzymów warunkujących prawidłowy wzrost kości.

Różnice między typami kości i pomiędzy poszczególnymi ich obszarami.

Różnice między typami kości.

Zęby, a szczególnie korona zęba wykazują prawie 90% składników nieorganicznych, głównie hydroksyapatytu. Zgodnie z oczekiwaniami, najwyższe stężenie Ca uzyskano w siekaczach (rys. 29). Zęby szczura muszą być mocne i twarde, co zapewnia duża zawartość minerałów.

Jednocześnie najwyższe stężenie Zn i Sr w siekaczach w porównaniu z innymi badanymi kośćmi wynika ze specyfiki zębów, które ścierając się, wymagają ciągłej odbudowy, nawet u starszych szczurów (rys. 41-42 i 47-48). Dlatego też rola tych pierwiastków w siekaczach jest znacząca w ciągu całego życia szczura, ponieważ są one odpowiedzialne za syntezę białek i enzymów w kościach [30-37].

Największą emisyjnością LIF cechowały się kości długie, a najmniejszą siekacze, które posiadają mniejszą zawartość składników organicznych (rys. 53 i 54). Większy wkład macierzy organicznej w kościach szkieletowych powoduje zwiększenie fluorescencji. Występujące różnice między badanymi kośćmi we fluorescencji z zakresu porfiryнового (600-650 nm), które przejawiały się wyraźnym pikiem w siekaczach, a jego nieobecnością w kościach długich (rys. 55) mogą być związane z faktem, iż zęby przez całe życie rosną. W związku z tym w tych strukturach istnieje konieczność dostarczania składników odżywczych, zwłaszcza u już wykształconych osobników starszych. Z uwagi na fakt, iż porfiryny występują w białkach zawierających hem, zaopatrujący tkanki w tlen, jest on widoczny w postaci pików fluorescencji LIF w zakresie czerwonym (600-650 nm). Jednocześnie ponieważ w strukturach hemu znajdują się jony Fe, jego obecność tłumaczy wyższą niż w innych

kościach zawartość Fe w siekaczach szczurów 28-dniowych, zwłaszcza w części zewnętrznej (nawet do 800 ppm, rys. 35).

Różnice między obszarami kości.

Wyższa zawartość Ca w gałęzi żuchwy (obszar A) niż w trzonie (obszar B) (rys. 29-52), wydaje się być związana z większym obciążeniem obszaru w bliskim położeniu stawu żuchwowo-skroniowego, w którym występuje duży nacisk podczas gryzienia pokarmu. Jednocześnie w kościach długich występują drobne różnice w zawartości pierwiastków śladowych między obszarami w okolicy nasad a trzonem kości. Wynikają one z faktu, iż przy nasadach występują ośrodki ossyfikacji, które są centrami rozwoju i przyrostu kości na długość. Często zdarza się, że jeden z nich przejmuje kontrolę i to w tym obszarze następuje najszybszy wzrost kości [81]. Zaobserwowane różnice w stężeniu składników mineralnych między poszczególnymi obszarami kości mogą być związane ze zróżnicowanymi funkcjami poszczególnych części kości, a w konsekwencji różnego stopnia ich rozwoju.

Wpływ leków podawanych samicom szczurzym w czasie ciąży

Porównanie zawartości pierwiastków, intensywności fluorescencji LIF oraz gęstości kości, których matkom podawano w czasie ciąży leki antywirusowe wykazała pewne różnice względem kości szczurów kontrolnych.

Wpływ indinawiru

Zaburzający wpływ *indinawiru* na komponenty kości objawił się w zmianie zawartości minerałów.

Poziom Ca został obniżony w większości kości (rys. 56-57). Utrzymująca się jego obniżona zawartość w czaszkach, żuchwach i udach najstarszych szczurów oznacza, iż *indinawir* może powodować zaburzenia mineralizacji kości, przez co mogą stać się mniej odporne na złamania.

Zmiany po *indinawirze* w stężeniach pierwiastków śladowych ujawniają się głównie w kościach młodszych szczurów, dążąc do wyrównania u 28-dniowych osobników (rys. 58-63). Należy jednak pamiętać, iż początkowy okres rozwoju jest najważniejszy i każde zaburzenie w tym okresie może powodować niekorzystne zmiany w tkance kostnej w późniejszym czasie. Obniżenie zawartości Zn i Sr w żuchwach i czaszkach może być odpowiedzialne za obniżenie zawartości Ca, ponieważ pierwiastki te regulują pracę enzymów i białek odpowiedzialnych za mineralizację [30-37, 39-40].

Obniżenie zawartości Fe widoczne najwyraźniej w piszczelach, może z kolei powodować zaburzenia w odkładaniu się włókien kolagenowych wzdłuż kryształów hydroksyapatytu [28].

Zmiany w składzie mineralnym kości szczurów, których matkom podawano *indinawir* są potwierdzone przez wyniki pomiaru gęstości badanych kości za pomocą radiografii cyfrowej. Widoczne było wyraźne, istotne statystycznie obniżenie gęstości kości głowy oraz kości udowych, zarówno u 14- jak i 28-dniowych szczurów (rys. 65-66), co może oznaczać obniżenie BMD.

Jak wynika z rys. 64, *indinawir* ujawnił niewielki wpływ na fluorescencję LIF. W większości przypadków nie zanotowano zmian w intensywności fluorescencji LIF, jedynie w siekaczach szczurów 14- i 28-dniowych oraz w piszczelach noworodków 7-dniowych była ona wyższa w stosunku do kontroli. Wzmocnienie fluorescencji LIF można tłumaczyć aktywnością *indinawiru* jako inhibitora proteazy. Jednoczesne obniżenie emisji światła w zakresie powyżej 600 nm w kościach szczurów, których matkom podawano *indinawir*, zwłaszcza w siekaczach, wydaje się być związane z zaburzeniem dynamiki i reaktywności chemicznej porfiryn przez *indinawir*. Jak donosi literatura [4-9] lek ten powoduje efekty uboczne układu hematologicznego i wątroby, w której rozkładana jest hemoglobina, m. in. anemię i hiperbilirubinemię. Siekacze jako tkanka,

która ciągle ulega odbudowie i zaopatrywaniu w tlen przez cząsteczki hemu, jest najbardziej na ten proces wrażliwa.

Podsumowując, wpływ podawania leku *indinawir* samicom szczurów na kości ich potomstwa ujawnia się głównie w zaburzeniach składników nieorganicznych kości. Obniżenie zawartości Ca oraz pierwiastków śladowych, a także obniżenie gęstości kości może oznaczać słabsze kości, bardziej narażone na złamania. Wpływ *indinawir* na macierz organiczną ograniczył się do zaburzenia pracy porfiryn związanych z hemem zaopatrującym tkanki w tlen w siekaczach.

Wpływ zidowudyny

Zmiany w zawartości Ca w kościach szczurów, których matkom aplikowano *zidowudynę* mają inny charakter niż wpływ *indinawiru*. W czaszkach 14- i 28-dniowych szczurów oraz udach szczurów 28-dniowych zaobserwowano co prawda obniżenie zawartości Ca względem kontroli, ale ciekawszym jest podwyższenie stężenia Ca w czaszkach i kościach długich 7-dniowych, żuchwach i piszczelach 14-dniowych oraz siekaczach 28-dniowych szczurów (rys. 56-57).

Badanie radiografii cyfrowej ujawniło podwyższenie gęstości kości, których matkom podawano *zidowudynę* względem kości kontrolnych (rys. 65-67). Zbyt wysoka gęstość kości nie jest zjawiskiem korzystnym, ponieważ zbyt duża zawartość sztywnych składników mineralnych może oznaczać nadmierne zwapnienie kości, powodujące zwiększone ryzyko złamań. Jednostka chorobowa cechująca się takimi zmianami opisana jest jako osteopetroza [82].

Wpływ *zidowudyny* na zawartość pierwiastków śladowych, podobnie jak wpływ *indinawiru*, ujawnia się głównie u najmłodszych szczurów, później następuje wyrównanie ich poziomu względem kontroli (rys. 58-63).

Wpływ *zidowudyny* na intensywność fluorescencji LIF był dużo większy niż wpływ *indinawiru*, zwłaszcza u najmłodszych osobników. W tab. 7 przedstawiającej różnice w intensywności LIF między kośćmi szczurów po podaniu *zidowudyny* a kośćmi kontrolnymi widoczne było znaczne (ponad 4-krotne) wzmocnienie fluorescencji w kościach długich, zwłaszcza w kościach udowych. *Zidowudyna*, jako analog nukleozydów, może konkurować z naturalnymi metabolitami o miejsce aktywne w enzymach, włączając się w nie i zakłócając ich działanie [10-14]. Może to tłumaczyć zmiany we fluorescencji składników organicznych i zawartości pierwiastków. Widoczny pobudzający wpływ leku *zidowudyna* na mechanizm działania lipidów, enzymów i witaminy D u 7-dniowych szczurów normalizuje się u starszych szczurów. Natomiast utrzymująca się u najstarszych szczurów obniżona emisyjność porfiryń w siekaczach może mieć negatywny wpływ na zaopatrywanie zębów w tlen i przez to zaburzać ich wzrost.

Podsumowując wpływ leku *zidowudyna* podawanego ciężarnym szczurzycom na kości ich potomstwa, można stwierdzić, iż powoduje on podwyższenie intensywności fluorescencji, przy czym organizm jednak wyrównuje jej poziom z wiekiem szczurów względem kontroli. Najbardziej wrażliwe na działanie *zidowudyny*, podobnie jak *indinawiru*, wydają się być porfiryńy w siekaczach. Jednocześnie lek ten podwyższa gęstość kości, co może powodować ich zbytnią kruchość i przez to łamliwość [82].

WNIOSKI

1. Zastosowana metoda fluorescencji X wykazała zmiany w zawartości Ca, Fe, Zn i Sr z wiekiem szczurów oraz różnice między obszarami na kościach oraz typami kości.
 - a. Zmiany zawartości Ca z wiekiem były niejednorodne, w niektórych kościach wzrastała (w czaszkach i udach), a w niektórych malała (w żuchwach), co związane jest prawdopodobnie z funkcją poszczególnych kości.
 - b. Stężenie Fe było utrzymywane na porównywalnym poziomie w pierwszym miesiącu życia szczurów, co może wynikać z działania zintegrowanych mechanizmów zapewniających jego homeostazę. Podwyższone stężenie Fe w siekaczach może wynikać z ich ścieraniem się i potrzebą ciągłej odbudowy.
 - c. Stężenie Zn i Sr było najwyższe w kościach najmłodszych szczurów i malało z ich wiekiem ze względu na najbardziej nasilone procesy tworzenia kości w pierwszym okresie wzrostu.
 - d. Kości różniły się nieznacznie zawartością pierwiastków w zależności od ich typu. W przypadku kości długich oraz żuchw obserwowano dodatkowe zróżnicowanie koncentracji pierwiastków zależną od specyfiki kości.
2. Różnice w macierzy organicznej wykazano w badaniach fluorescencji LIF z wiekiem szczurów oraz między typami kości.
 - a. Intensywność fluorescencji malała z wiekiem szczurów prawdopodobnie ze względu na wzrastającą mineralizację.
 - b. Największa fluorescencja LIF była w kościach udowych, a najmniejsza w siekaczach, najbardziej zmineralizowanych kościach.

3. Wpływ leków *indinawir* i *zidowudyna* podawanych szczurzym w czasie ciąży został zaobserwowany we wszystkich stosowanych technikach (fluorescencja X, fluorescencja LIF i radiografia cyfrowa).
- a. Wpływ *indinawiru* ujawnił się głównie w obniżeniu poziomu Ca w kościach oraz porfiryń w siekaczach, co spowodowało zmniejszenie gęstości kości w porównaniu z kontrolą. Może to powodować osłabienie tkanki kostnej.
 - b. *Zidowudyna* głównie modyfikowała fluorescencję macierzy organicznej powodując wzrost jej fluorescencji zwłaszcza u najmłodszych szczurów oraz obniżenie fluorescencji w zakresie 600-650 nm w siekaczach. Oznacza to, że *zidowudyna* może powodować zaburzenia w pracy białek i enzymów w tkance kostnej. Jednocześnie kości szczurów, których matkom podawano *zidowudynę* miały większą gęstość niż kości szczurów kontrolnych, co może doprowadzić do zwiększonego ryzyka złamań.

Praca została częściowo zrealizowana w ramach grantu o numerze 2P05D 08530.

Autorka pracy w trakcie trwania studiów doktoranckich otrzymywała stypendium realizowane w ramach projektu „Uniwersytet Partnerem Gospodarki Opartej na Wiedzy”.

LITERATURA

- [1] O. Androsz, M. Dragan, P. Pulik, R. Górską, Lesions the Oral Mucosa in HIV Patients in Various Stages of the Disease, *Dent. Med. Probl* 41(4), 615–623, 2004
- [2] T. Nishimura, Y. Seki, K. Sato, T. Chishu, N. Kose, T. Terasaki, Y.S. Kang, Y. Sai, E. Nakashima, Enhancement of zidovudine uptake by dehydroepiandrosterone sulfate in rat syncytiotrophoblast cell line TR-TBT 18d-1, *Drug Metab Dispos.* 36(10), 2080-5, 2008
- [3] W. Halota, J. Juszczak (red.), HIV/AIDS — podręcznik dla lekarzy i studentów, Wydawnictwo Termedia, Poznań, 2006
- [4] Aneks I. Charakterystyka Produktu Leczniczego Crixivan, Merck Sharp & Dohme B.V., 2006, <http://www.ema.europa.eu> z dnia 6 października 2012
- [5] K. Riecke, T.G. Schulz, M. Shakibaei, B. Krause, I. Chahoud, R. Stahlmann, Developmental toxicity of the HIV-protease inhibitor indinavir in rats, *Teratology* 62(5), 291-300, 2000
- [6] R.G. Jain, J.M. Lenhard, Select HIV protease inhibitors alter bone and fat metabolism ex vivo, *Biol Chem.* 277(22), 19247-50, 2002
- [7] M. W.-H. Wang, S. L. Teitelbaum, P. Tebas, W. G. Powderly, F. P. Ross, Indinavir Inhibits Bone Formation while Ritonavir Inhibits Osteoclast Differentiation and Function, 8th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Washington, 2001
- [8] A. Dusso, M. Vidal, W.G. Powderly, K.E. Yarasheski, P. Tebas, Protease Inhibitors Inhibit In Vitro Conversion Of 25(OH)-Vitamin D To 1,25(OH)₂-Vitamin D, *Antiviral Therapy* 5(5), 19, 2000
- [9] K. Mondy, P. Tebas, Bone Abnormalities in HIV-infected Patients on HAART, *AIDS Reviews* 3(2), 2001

- [10] O.A. Olivero, R. Parikka, M.C. Poirier, K. Vähäkangas, 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) transplacental perfusion kinetics and DNA incorporation in normal human placentas perfused with AZT, *Mutat Res.* 428 (1-2), 41-47, 1999
- [11] Q. Meng, D.M. Walker, O.A. Olivero, X. Shi, B.B. AntiochosB, M.C. Poirier, V.E. Walker, Zidovudine-didanosine coexposure potentiates DNA incorporation of zidovudine and mutagenesis in human cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(23), 12667-71, 2000
- [12] Aneks I. Charakterystyka Produktu Leczniczego Combivir, GlaxoSmithKline Pharmaceuticals S.A., <http://www.ema.europa.eu> z dnia 6 października 2012
- [13] Public Health Service Task Force, „Recommendations for Use of Antiretroviral Drugs In Pregnant HIV-Infected Women for Maternal Health and Interventions to Reduce Perinatal HIV Transmission In the United States”, Perinatal HIV Guidelines Working Group, 2 November 2007
- [14] A. Staal, M.H. French, L.M. Watson, V.G. Sasseville, J.H.M. Feyen, Effects Of Nucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors And Protease Inhibitors On Bone Explants In Vitro, *Antiviral Therapy* 6(4), 79, 2001
- [15] S. Bandyopadhyay-Ghosh, Bone as a Collagen-hydroxyapatite Composite and its Repair, *Trends Biomater. Artif. Organs* Vol 22(2), 116-124, 2008
- [16] P. Fratzl, H.S. Gupta, E.P. Paschalis, P. Roschger, Structure and mechanical quality of the collagen–mineral nano-composite in bone, *J. Mater. Chem.*, 14, 2115-2123, 2004
- [17] J.D. Termine, Non-collagen protein in bone, *Ciba Found Symp.* 136, 178-202, 1988

- [18] J. Deszczyński, G. Szczęsny, Proces zrostu kości - patofizjologia i zagadnienia kliniczne. Przebieg zrostu kostnego oraz czynniki fizyczne warunkujące jego wystąpienie, *Ortopedia, traumatologia, rehabilitacja* 2(3), 10-20, 2000
- [19] Strona firmowa producenta aparatury mikroskopowej,
<http://www.fei.com/resources/image-gallery/knee-joint-capsule-7329.aspx> z dnia 6 października 2012
- [20] D.A. Wahl, J.T. Czernuszka, Collagen-Hydroxyapatite Composites For Hard Tissue Repair, *Eur Cell Mater* 11, 43-56, 2006
- [21] P. Kuropka, J. Kuryszko, S. Mazurkiewicz-Lyczewska, Mineralizacja tkanki kostnej, *Medycyna Weterynaryjna* 62(5), 557-559, 2006
- [22] Strona Amerykańskiego Narodowego Instytutu Raka w Narodowym Instytucie Zdrowia,
<http://training.seer.cancer.gov/anatomy/skeletal/growth.html> z dnia 6 października 2012
- [23] M. Percival, Bone Health & Osteoporosis w: *Applied Nutritional Science Reports*, Advanced Nutrition Publications Inc. 11/99, 1999
- [24] M. Rahnema, J. Błoniarz, Changes Of The Calcium Metabolism In Mineralized Tissues Of Rats During Experimental Postmenopausal Osteoporosis, *Bull Vet Inst Pulawy* 48, 467-470, 2004
- [25] R.G.G. Russell, A.M. Caswell, P.R. Hearn, R.M. Sharrard, Calcium In Mineralized Tissues And Pathological Calcification, *Br Med Bull* 42(4), 435-446, 1986
- [26] D.M. Medeiros, A. Plattner, D. Jennings, B. Stoecker, Bone morphology, strength and density are compromised in iron-deficient rats and exacerbated by calcium restriction, *J Nutr.* 132(10), 3135-41, 2002

- [27] J.H. Beattie, A. Avenell, Trace Element Nutrition and Bone Metabolism, *Nutrition Research Reviews* 5(1), 167-188, 1992
- [28] M.M. Harris, L.B. Houtkooper, V.A. Stanford, C. Parkhill, J.L. Weber, H. Flint-Wagner, L. Weiss, S. B. Going, T.G. Lohman, Dietary Iron Is Associated with Bone Mineral Density in Healthy Postmenopausal Women, *J. Nutr.* 133(11), 3598-3602, 2003
- [29] S.S. Nadadur, K. Srirama, A. Mudipalli, Iron transport & homeostasis mechanisms: their role in health & disease, *Indian J Med Res.* 128(4), 533-44, 2008
- [30] M. Yamaguchi, Nutritional factors and bone homeostasis: synergistic effect with zinc and genistein in osteogenesis, *Mol Cell Biochem.* 366 (1-2), 201-21, 2012
- [31] M. Yamaguch, Role of zinc in bone formation and bone resorption, *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* 11(2-3), 119-135, 1998
- [32] Z.J. Ma, M. Yamaguchi, Role of endogenous zinc in the enhancement of bone protein synthesis associated with bone growth of newborn rats, *J Bone Miner Metab.* 19(1), 38-44, 2001
- [33] Z.J. Ma, M. Yamaguchi, Alternation in bone components with increasing age of newborn rats: role of zinc in bone growth, *Bone Miner Metab.* 18(5), 264-70, 2000
- [34] M. Yamaguchi, Y.H. Gao, Z.J. Ma, Synergistic effect of genistein and zinc on bone components in the femoral-metaphyseal tissues of female rats, *J Bone Miner Metab.* 18(2), 77-83, 2000
- [35] D.L. Bouglé, J.P. Sabatier, G. Guaydier-Souquières, F. Guillon-Metz, D. Laroche, P. Jauzac, F. Bureau, Zinc status and bone mineralisation in adolescent girls, *J Trace Elem Med Biol.*, 18(1), 17-21, 2004

- [36] Y. Li Y, Z.L. Yu, Effect of zinc on bone metabolism in fetal mouse limb culture, *Biomed Environ Sci.*, 15(4), 323-9, 2002
- [37] S. Gomez, E.A. Preoteasa, L. Harangus, A. Iordan, D. Grambole, F. Herrmann, Micro-PIXE and histochemical studies of Zn and Ca distribution in normal bone, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B* 249 (1-2), 673-676, 2006
- [38] F. Bronner, Metals in Bone: Aluminum, Boron, Cadmium, Chromium, Lead, Silicon, and Strontium w: *Principles of Bone Biology*, Elsevier Inc., 359-369, 2002
- [39] M. Sila-Asna, A. Bunyaratvej, S. Maeda, H. Kitaguchi, N. Bunyaratavej, Osteoblast Differentiation and Bone Formation Gene Expression in Strontium-inducing Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell, *Kobe J. Med. Sci.* 53(1), 25-35, 2007
- [40] P.J. Marie, M. Hott, D. Modrowski, C. DePollak, J. Guillemain, P. Deloffre, Y. Tsouderos, An uncoupling agent containing strontium prevents bone loss by depressing bone resorption and maintaining bone formation in estrogen-deficient rats, *J. Bone Miner. Res.* 8, 607-615, 1993
- [41] B. Dziunikowski, *Energy dispersive X-ray fluorescencje analysis*, PWN Warszawa, 1989
- [42] J. Fijałkowski, *Wybrane zagadnienia analitycznej spektrometrii atomowej*, Wydawnictwo Polskiej Akademii Nauk, Wrocław, 1987
- [43] L.S. Birks, *X-ray spectrochemical analysis*, John Wiley & Sons, Nowy Jork, 1969
- [44] H.A. van Sprang, *Fundamental Parameter Methods in XRF Spectroscopy*, *Advances in X-ray Analysis*, Vol.42, 2000

- [45] R. Sitko, B. Zawisza, Quantification in X-Ray Fluorescence Spectrometry, in X-Ray Spectroscopy, S.K. Sharma (Ed.), InTech, 137-162, 2012
- [46] E.P. Bertin, Principles and practice of X-ray spectrometric analysis, Plenum Presss, Nowy Jork, 1975
- [47] P. Lemberge, Quantitative X-Ray Fluorescence Analysis Using Partial Least Squares and Monte Carlo Simulations, PhD thesis, Antwerpen, 2000
- [48] R.M. Rousseau, Some considerations on how to solve the Sherman equation in practice, Spectrochim. Acta Part B 59, 1491–1502, 2004
- [49] W. Margaret, A.T. Ellis, P.J. Potts, C. Streli, C. Vanhoof, D. Wegrzynek, P. Wobrauschek, Atomic spectrometry update. X-Ray fluorescence spectrometry, J. Anal. At. Spectrom. 24, 1289-1326, 2009
- [50] B. Pemmer, C. Weixelbaumer, M. Foelser, A. Roschger, J.G. Hofstaetter, P. Wobrauschek, R. Windhager, S. Lang, R. Simon, P. Roschger, K. Klaushofer, C. Streli, Distribution Of Trace Elements In The Mineralized Matrix Of Human Osteosarcoma Tissue, 61st Annual Cnference on Application of X-ray Analysis, Denver, 2012
- [51] F. Rastegar, E.A. Maier, R. Heimbürger, C. Christophe, C. Ruch, M.J. Leroy, Simultaneous determination of trace elements in serum by energy-dispersive x-ray fluorescence spectrometry, Clin Chem. 30(8), 1300-3, 1984
- [52] E. Jallot, Micro and nano-ion beam analysis of trace elements at biomaterials/living tissues interface, International Journal of Trends in Medicine 1, 46-49, 2011
- [53] C. Chiojdeanu, D.C. Stan, B. Constantinescu, Gold and silver coating characterization using an X-ray fluorescence based method – the case of archaeological artifacts, Romanian Reports in Physics 63(3), 685–692, 2011

- [54] M.A. Briggs-Kamara, Elemental analysis of selected epidermal creams by X-ray fluorescence (XRF) spectrometry, *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering* 2(5), 334-340, 2012
- [55] Strona Pracowni Podstaw Biofizyki Uniwersytetu Warszawskiego, https://brain.fuw.edu.pl/edu/FZ:Pracownia_Podstaw_Biofizyki/PPB10 z dnia 6 października 2012
- [56] J. Twardowski, *Biospektroskopia*, t. 3, PWN Warszawa, 1989
- [57] R. Richards-Kortum, E. Sevick-Muraca, Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. *Annual Review of Physical Chemistry* 47, 555-606, 1996
- [58] S.S. Thomas, *Spectroscopic Investigation of Tooth Caries and Demineralization*, PhD thesis, Thiruvananthapuram, 2009
- [59] A.S. Ladokhin, *Fluorescence Spectroscopy in Peptide and Protein Analysis* w: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Meyers (Ed.), John Wiley & Sons Ltd, Nowy Jork, 2000
- [60] D.R. Webster, M.S. Rahman, L.P. Dasi, Laser-Induced Fluorescence Measurements of a Turbulent Plume, *Journal of Engineering Mechanics*, 129(10), 2003
- [61] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence spectroscopy*, Kluwer Academic, Plenum Publisher, New York, 1999
- [62] R.M. Hoffman, Advantages of multi-color fluorescent proteins for whole-body and in vivo cellular imaging, *J Biomed Opt.* 10(4), 41202, 2005
- [63] S. Andersson-Engels, J. Johansson, U. Stenram, K. Svanberg, S. Svanberg, Malignant tumor and atherosclerotic plaque diagnosis using laser-induced fluorescence, *Journal of Quantum Electronics* 26, 2207 – 2217, 1990
- [64] A. Pradhan, P. Pal, G. Durocher, L. Villeneuve, A. Balassy, F. Babai, L. Gaboury, L. Blanchard, Steady state and time-resolved fluorescence

- properties of metastatic and non-metastatic malignant cells from different species, *J Photochem Photobiol B.* 31(3), 101-12, 1995
- [65] A.F. Zuluaga, U. Utzinger, A. Durkin, H. Fuchs, A. Gillenwater, R. Jacob, B. Kemp, J. Fan, R. Richards-Kortum, Fluorescence Excitation Emission Matrices of Human Tissue: A System for in Vivo Measurement and Method of Data Analysis, *Applied Spectroscopy* 53(3), 302-311, 1999
- [66] M. Zellweger, Fluorescence Spectroscopy Of Exogenous, Exogenously-Induced And Endogenous Fluorophores For The Photodetection And Photodynamic Therapy Of Cancer, PhD Thesis, 2000
- [67] A. Graczyk, Fotodynamiczna metoda rozpoznawania i leczenia nowotworów, Dom Wydawniczy Bellona, Warszawa, 1999
- [68] S. Andersson-Engels, C. Klinteberg, K. Svanberg, S. Svanberg, In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics, *Phys Med Biol.* 42(5), 815-24, 1997
- [69] M. Than Htun, Characterization of high-density polyethylene using laser-induced fluorescence (LIF), *Journal of Polymer Research* 19(2), 1-6, 2012
- [70] C. Mühlig, Laser induced fluorescence for detecting residual impurities in optical thin films at 193 nm excitation, Application note, Andor Technology, 2011
- [71] M. Szpranger-Nodzak, M. Wochna-Sobańska, Stomatologia wieku rozwojowego, PZWL Warszawa, 2003
- [72] M. Kozakiewicz, E. Gaszyńska, M. Denkowski, P. Arkuszewski, Ocena zmian gęstości optycznej nakładkowych przeszczepów kości własnopochodnej z bródki zastosowanych dla zmiany cech podłoża protetycznego, *Protet. Stomatol.* LVI, 6, 436-443, 2006
- [73] R. Koszowski, A. Raczkowska–Siostrzonek, Radiological Evaluation of Bone Regenerate After Mandibular Alveolar Ridge Distraction Osteogenesis – Case Report, *Dent. Med. Probl.* 43(2), 299–304, 2006

- [74] G.A. da Cruz, M.E.L. de MORAES, L.C. de Moraes, R.F. da Rocha, I. Balducci, Evaluation of optical density of rats tibiae bone repair treated with rofecoxib. Pilot study, *Cienc Odontol Bras* 11(3), 21-25, 2008
- [75] M. Fernandes Gomes, M. Fernanda de Souza, S. Destro, É.C. de Freitas Banzi, E.M. Marçal Vieira, A.R. Cantarelli Morosolli, M. das Graças Vilela Goulart, Optical density of bone repair after implantation of homogenous demineralized dentin matrix in diabetic rabbits, *Braz Oral Res* 22(3), 275-80, 2008
- [76] R.Redus, XRF Spectra and Spectra Analysis Software, Application Note XRF-1 Rev B1, Amptek Inc., 1-14, 2008
- [77] B. Redus, Efficiency of Amptek XR-100T-CdTe and -CZT Detectors, Application Note ANCZT-1 Rev 2, 2002
- [78] I. Schisler, Anizotropia fluorescencji wybranych fluoroforów endogennych, Katowice 2012
- [79] R.I. Gafni, J. Baron, Childhood Bone Mass Acquisition and Peak Bone Mass May Not Be Important Determinants of Bone Mass in Late Adulthood, *Pediatrics* 119(2), 131, 2007
- [80] R. Takeda, T. Nakamura, M. Imanishi, M. Ishida, F. Yano, T. Takeda, M. Kimura, A study on spontaneously obese rat (Minko rat) with abnormal lipid metabolism, strength and mineral concentrations in bone, *J Am Coll Nutr.* 23(6), 712-4, 2004
- [81] H.A. Sissons, N.F. Kember, Longitudinal bone growth of the human femur, *Postgraduate Medical Journal* 53, 433-436, 1977
- [82] A. Villa, M.M. Guerrini, B. Cassani, A. Pangrazio, C. Sobacchi, Infantile Malignant, Autosomal Recessive Osteopetrosis: The Rich and The Poor, *Calcif Tissue Int* 84, 1–12, 2009

SPIS RYSUNKÓW

Rys. 1. Zdjęcie z mikroskopu SEM włókien kolagenu [19]	17
Rys. 2. Schemat Jabłońskiego [55]	31
Rys. 3. Obrazy mierzonych kości z zaznaczonymi obszarami zainteresowania: (a) kość ciemieniowa (obszar A i A') i czołowa (obszar B i B') pokrywy czaszki, (b) gałąź (obszar A) oraz trzon (obszar B) żuchwy oraz część wewnętrzna siekacza (obszar A) i część zewnętrzna siekacza (obszar B), (c) koniec bliższy (obszar A), trzon (obszar B) i koniec dalszy (obszar C) kości udowej, (d) koniec bliższy (obszar A), trzon (obszar B) i koniec dalszy (obszar C) kości piszczelowej.....	38
Rys. 4. Układ pomiarowy do badania fluorescencji X	40
Rys. 5. Układ pomiarowy do badania fluorescencji LIF	42
Rys. 6. Układ pomiarowy radiografii cyfrowej	43
Rys. 7. Przykładowa kość piszczelowa 28-dniowego szczura kontrolnego z zaznaczonymi obszarami ROI	44
Rys. 8. Widma fluorescencji X przed kalibracją energetyczną (a) i po kalibracji energetycznej (b)	46
Rys. 9. Widmo fluorescencji X próbki referencyjnej Bone Meal przed i po przetworzeniu	52
Rys. 10. Powiększony zakres widma fluorescencji X do 1600 zliczeń.....	52
Rys. 11. Wykres korelacji stężeń uzyskanych w eksperymencie względem stężeń certyfikowanych dla próbek walidacyjnych Ca (a) oraz Fe (b)	53
Rys. 12. Przykładowe widma fluorescencji X pochodzące z kości ciemieniowej (obszar A i A') oraz czołowej (obszar B i B') czaszki 28-dniowego szczura kontrolnego	56
Rys. 13. Przykładowe widma fluorescencji X pochodzące z okolic końca bliższego i dalszego kości piszczelowych oraz kości ciemieniowej i czołowej czaszki 28-dniowego szczura, którego matce podawano zidowudynę	57

Rys. 14. Reprezentatywne surowe widma fluorescencji X żuchw kontrolnych szczurów 7-, 14- i 28-dniowych.....	58
Rys. 15. Przykładowe widma fluorescencji X pochodzące z okoli końca bliższego kości udowych 7-, 14- i 28-dniowych szczurów, których matkom podawano indinawir	59
Rys. 16. Przykładowe widma fluorescencji X pochodzące z siekaczy 28-dniowych szczurów: kontrolnego, po matczynej aplikacji indinawirem i zidowudyną.....	60
Rys. 17. Reprezentatywne widma po przetworzeniu żuchw szczurów kontrolnych 7-, 14- i 28-dniowych	61
Rys. 18. Reprezentatywne widma XRF po przetworzeniu zebrane z siekaczy szczurów 28-dniowych	62
Rys. 19. Reprezentatywne surowe widma fluorescencji LIF czaszek szczurów kontrolnych 7-, 14- i 28-dniowych przed (a) i po (b) normalizacji	66
Rys. 20. Przykładowe widma LIF 28-dniowych szczurów kontrolnych z różnych kości	66
Rys. 21. Przykładowe widma LIF 14-dniowych szczurów, których matkom podawano indinawir z różnych obszarów kości piszczelowej.....	67
Rys. 22. Przykładowe widma LIF 7-dniowych szczurów z grup lekowych i kontroli.....	68
Rys. 23. Widma LIF próbek referencyjnych: kości (BM) oraz wapienia (KH-2)	69
Rys. 24. Mapy fluorescencji w zakresie 220-550 nm kości referencyjnej SRM BM (a) oraz wapienia KH-2 (b)	70
Rys. 25. Przykładowe zdjęcia radiografii cyfrowej kości udowych szczurów kontrolnych.....	72
Rys. 26. Przykładowe zdjęcia radiografii cyfrowej czaszki 14-dniowych szczurów z grup lekowych oraz kontroli	73
Rys. 27. Przykładowe zdjęcia radiografii cyfrowej kości piszczelowych 28-dniowych szczurów z grup lekowych oraz kontroli	74

Rys. 28. Stężenia pierwiastków w lewych i prawych kościach udowych 28-dniowych szczurów kontrolnych	75
Rys. 29. Stężenie Ca w kościach głowy i siekaczach szczurów kontrolnych	76
Rys. 30. Stężenia Ca w kościach długich szczurów kontrolnych	76
Rys. 31. Stężenie Ca w kościach głowy i siekaczach szczurów, których matkom podawano indinawir	77
Rys. 32. Stężenie Ca w długich szczurów, których matkom podawano indinawir	77
Rys. 33. Stężenie Ca w kościach głowy i siekaczach szczurów, których matkom podawano zidowudynę	78
Rys. 34. Stężenie Ca w kościach długich szczurów, których matkom podawano zidowudynę	78
Rys. 35. Stężenie Fe w kościach głowy i siekaczach szczurów kontrolnych	79
Rys. 36. Stężenie Fe w kościach długich szczurów kontrolnych	79
Rys. 37. Stężenie Fe w kościach głowy i siekaczach szczurów, których matkom podawano indinawir	80
Rys. 38. Stężenie Fe w kościach długich szczurów, których matkom podawano indinawir	80
Rys. 39. Stężenie Fe w kościach głowy i siekaczach szczurów, których matkom podawano zidowudynę	81
Rys. 40. Stężenie Fe w kościach długich szczurów, których matkom podawano zidowudynę	81
Rys. 41. Stężenie Zn w kościach głowy i siekaczach szczurów kontrolnych	82
Rys. 42. Stężenia Zn w kościach długich szczurów kontrolnych	82
Rys. 43. Stężenie Zn w kościach głowy i siekaczach szczurów, których matkom podawano indinawir	83

Rys. 44. Stężenie Zn w kościach długich szczurów, których matkom podawano indinawir	83
Rys. 45. Stężenie Zn w kościach głowy i siekaczach szczurów, których matkom podawano zidowudynę	84
Rys. 46. Stężenie Zn w kościach długich szczurów, których matkom podawano zidowudynę	84
Rys. 47. Stężenie Ca w kościach głowy i siekaczach szczurów kontrolnych	85
Rys. 48. Stężenie Sr w kościach długich szczurów kontrolnych	85
Rys. 49. Stężenie Sr w kościach głowy i siekaczach szczurów, których matkom podawano indinawir	86
Rys. 50. Stężenie Sr w długich szczurów, których matkom podawano indinawir	86
Rys. 51. Stężenie Sr w kościach głowy i siekaczach szczurów, których matkom podawano zidowudynę	87
Rys. 52. Stężenie Sr w kościach długich szczurów, których matkom podawano zidowudynę	87
Rys. 53. Widma fluorescencji LIF kości głowy (pokrywy czaszki, żuchwy) oraz siekaczy szczurów 7-, 14- i 28-dniowych kontrolnych, po matczynym podaniu indinawiru oraz po matczynym podaniu zidowudyny.....	88
Rys. 54. Widma fluorescencji LIF kości długich (udowych i piszczelowych) szczurów 7-, 14- i 28-dniowych kontrolnych, po matczynym podaniu indinawiru oraz po matczynym podaniu zidowudyny.....	89
Rys. 55. Widma fluorescencji LIF znormalizowane do maksimum pików kości 7-, 14- i 28-dniowych szczurów kontrolnych.....	91
Rys. 56. Stężenie Ca w kościach głowy i siekaczach szczurów z grup lekowych względem kontroli.....	97
Rys. 57. Stężenie Ca w kościach długich szczurów z grup lekowych względem kontroli (k – kontrola, ind – indinawir, zid – zidowudyna, * - $p < 0.05$).....	98

Rys. 58. Stężenie Fe w kościach głowy i siekaczach szczurów z grup lekowych względem kontroli (k – kontrola, ind – indinawir, zid – zidowudyna, * - $p < 0.05$)	99
Rys. 59. Stężenie Fe w kościach długich szczurów z grup lekowych względem kontroli (k – kontrola, ind – indinawir, zid – zidowudyna, * - $p < 0.05$).....	100
Rys. 60. Stężenie Zn w kościach głowy i siekaczach szczurów z grup lekowych względem kontroli (k – kontrola, ind – indinawir, zid – zidowudyna, * - $p < 0.05$)	101
Rys. 61. Stężenie Zn w kościach długich szczurów z grup lekowych względem kontroli (k – kontrola, ind – indinawir, zid – zidowudyna, * - $p < 0.05$).....	102
Rys. 62. Stężenie Sr w kościach głowy i siekaczach szczurów z grup lekowych względem kontroli (k – kontrola, ind – indinawir, zid – zidowudyna, * - $p < 0.05$)	103
Rys. 63. Stężenie Sr w kościach długich szczurów z grup lekowych względem kontroli (k – kontrola, ind – indinawir, zid – zidowudyna, * - $p < 0.05$).....	104
Rys. 64. Średnie intensywności fluorescencji LIF w maksimum pików w kościach szczurów grup lekowych (i – indinawir, z – zidowudyna) względem kontroli (k)	105
Rys. 65. Średni poziom szarości ROI w czaszkach (cz), żuchwach (z), udach (u) i piszczelach (p) 7-dniowych szczurów w grupach lekowych (ind – indinawir, zid – zidowudyna) względem kontroli (kontr)	109
Rys. 66. Średni poziom szarości ROI w czaszkach (cz), żuchwach (z), udach (u) i piszczelach (p) 14-dniowych szczurów w grupach lekowych (ind – indinawir, zid – zidowudyna) względem kontroli (kontr)	110
Rys. 67. Średni poziom szarości ROI w czaszkach (cz), żuchwach (z), udach (u) i piszczelach (p) 28-dniowych szczurów w grupach lekowych (ind – indinawir, zid – zidowudyna) względem kontroli (kontr)	111

SPIS TABEL

Tab. 1. Endogenne fluorofory występujące w tkankach ludzkich.....	34
Tab. 2. Certyfikowana zawartość pierwiastków w materiale referencyjnym wapienia KH-2	47
Tab. 3. Certyfikowana zawartość pierwiastków w materiale referencyjnym kości SRM Bone Meal.....	48
Tab. 4. Parametry analizy FP	55
Tab. 5. Wyznaczone stężenia pierwiastków w reprezentatywnej żuchwie kontrolnego szczura 28-dniowego	63
Tab. 6. Stężenia Ca, Fe, Zn i Sr w wybranych całych oraz zmielonych kościach piszczelowych 28-dniowych szczurów kontrolnych	65
Tab. 7. Średnie w kościach 7-dniowych szczurów kontrolnych oraz zmiany średniej intensywności fluorescencji LIF w maksimum pików w grupach lekowych względem kontroli.....	106
Tab. 8. Stosunek intensywności fluorescencji LIF w maksimum pików porfiryнового w grupach lekowych (indinawir i zidowudyna) do intensywności fluorescencji LIF w maksimum pików porfiryнового w kontroli.....	107